



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

**VLIV TEPLoty A SUCHA NA OBSAH PROTEINŮ
GLUTENINOVÉ FRAKCE U DVOU GENOTYPŮ
PŠENICE**

THE EFFECT OF TEMPERATURE AND DROUGHT ON THE GLUTENIN PROTEINS CONTENT IN TWO
GENOTYPES OF WHEAT

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Lukáš Vybíral

VEDOUcí PRÁCE

SUPERVISOR

PhDr. Miroslav Hrstka, Ph.D.

BRNO 2019

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1425/2018
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Student: **Lukáš Vybíral**
Studijní program: Chemie a technologie potravin
Studijní obor: Potravinářská chemie
Vedoucí práce: **PhDr. Miroslav Hrstka, Ph.D.**
Akademický rok: 2018/19

Název bakalářské práce:

Vliv teploty a sucha na obsah proteinů gluteninové frakce u dvou genotypů pšenice

Zadání bakalářské práce:

Na základě studia literatury napsat pojednání o vlivu teploty a sucha na složení a obsah lepkových bílkovin u pšenice seté. Zvláště se zaměřit na změny v obsahu gluteninů.

V experimentální části sledovat obsah proteinů gluteninové frakce u dvou genotypů pšenice v závislosti na teplotě a suchu.

Termín odevzdání bakalářské práce: 24.5.2019

Bakalářská práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí bakalářské práce.

Lukáš Vybíral

student(ka)

PhDr. Miroslav Hrstka, Ph.D.

vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.

vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2019

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.

děkan

ABSTRAKT

Tato bakalářská práce se zabývá vlivem nedostatku vody a teploty na obsah proteinů gliadinové frakce a na poměr gluteniny/gliadiny u dvou odrůd pšenice. Odrůdy, které byly vybrány pro experiment, se jmenují Pannonia a RGT Reform. Vzorky byly kultivovány při třech různých teplotách a to 26, 32 a 38 °C a v době kvetení bylo kontrolováno zavlažování. U vzorků, které byly zavlažovány, měla půda vlhkost větší než 70 %, vzorky stresované suchem rostly na půdě, jejíž vlhkost nepřesahovala 30 %. Po sklizni byla zrna rozemleta na mouku a z jednotlivých vzorků byly extrahovány gluteniny a gliadiny. Pro separaci byla použita metoda SDS-PAGE, kvantifikace proteinů byla provedena počítačovou denzitometrií. Byl zjištěn významný vliv odrůdy na jednotlivé lepkové proteiny. U odrůdy Pannonia bylo zjištěno, že interakce vyšší teploty a sucha, nemá velký vliv na obsah gluteninů, ani na poměr gluteniny/gliadiny. Odrůda RGT byla těmito podmínkami podstatně více ovlivněna, což se projevilo poklesem obsahu gluteninů a výraznou změnou poměru gluteniny/gliadiny. U obou odrůd byl obsah gluteninů vyšší při kultivaci za mokra než za sucha, ale pouze při vyšších kultivačních teplotách.

ABSTRACT

This bachelor thesis deals with the influence of water and temperature deficiency on protein content of gliadin fraction and on glutenin/gliadin ratio in two wheat varieties. The varieties selected for the experiment are called Pannonia and RGT Reform. Samples were cultivated at three different temperatures, 26 °C, 32 °C and 38 °C, and irrigation was checked at the time of flowering. For wet-grown samples, the soil had a moisture content greater than 70 %, and drought-grown specimens grew on soil with a moisture content not exceeding 30 %. After harvest, the grains were ground into flour and glutenins and gliadins were extracted from the individual samples. SDS-PAGE was used for separation and protein quantification was performed by computer densitometry. A significant effect of the variety on individual gluten proteins was found. In the Pannonia variety, it has been found that the interaction of higher temperature and drought has no major effect on glutenin content and glutenin/gliadin ratio. The RGT variety was significantly affected by these conditions, resulting in a decrease in glutenin content and a significant change in ratio. In both varieties, the glutenin content was higher when cultivated at higher humidity but only at two higher cultivation temperatures.

KLÍČOVÁ SLOVA

pšenice, gluteniny, gliadiny, sucho, teplota, SDS-PAGE

KEY WORDS

wheat, glutenins, gliadins, drought, temperature, SDS-PAGE

VYBÍRAL, Lukáš. *Vliv teploty a sucha na obsah proteinů gluteninové frakce u dvou genotypů pšenice*. Brno, 2019. Dostupné také z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/115736>. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce PhDr. Miroslav Hrstka, Ph.D.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracoval samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citoval. Bakalářská práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické Vysokého učení technického v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího bakalářské práce a děkana FCH VUT v Brně.

.....

podpis autora

Poděkování: Zde bych moc rád poděkoval mému vedoucímu bakalářské práce panu PhDr. Miroslavu Hrstkovi, Ph.D., za všechen čas věnovaný této práci, za velmi cenné a užitečné rady, za vstřícný přístup, za veškerou pomoc a podporu. Dále bych chtěl poděkovat mé rodině a blízkým za velkou podporu po celou dobu studia. A v neposlední řadě bych chtěl poděkovat paní Ing. Michaele Cigánkové za rady, pomoc a čas, po který se mi věnovala.

OBSAH

1.	ÚVOD.....	7
2.	TEORETICKÁ ČÁST	8
2.1	Globální klimatická změna.....	8
2.2	Skleníkový efekt.....	9
2.3	Vliv globální klimatické změny na rostliny	9
2.4	Význam pšenice.....	10
2.5	Morfologie pšeničného zrna	11
2.6	Pšeničné proteiny.....	12
2.6.1	Albuminy a globuliny.....	14
2.6.2	Lepek a lepkové proteiny	14
2.7	Technologická jakost pšenice	16
2.7.1	Objemová výtěžnost (Rapid Mix Test)	17
2.7.2	Obsah dusíkatých látek.....	18
2.7.3	Zeleného sedimentační test	18
2.7.4	Číslo poklesu (The Hagberg Falling Number).....	18
2.7.5	Objemová hmotnost	19
2.7.6	Vaznost mouky.....	19
2.7.7	Doplňková kritéria.....	19
2.8	Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu – SDS-PAGE	19
3.	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	21
3.1	Materiál – vzorky	21
3.2	Stanovení obsahu gluteninů metodou SDS-PAGE.....	22
3.2.1	Přístroje	22
3.2.2	Chemikálie	22
3.2.3	Příprava roztoků	23
3.2.4	Příprava vzorků	24
3.2.5	Příprava gelů	24
3.2.6	Elektroforéza	25
3.2.7	Vizualizace bílkovin.....	26
3.3	Vyhodnocení gelů.....	26

3.4	Statistické zpracování výsledků	26
4.	VÝSLEDKY.....	27
4.1	Celkový obsah gluteninů při kultivaci za sucha a za mokra při různých teplotách	28
4.2	Poměr obsahu celkových gluteninů k obsahu gliadinů při kultivaci za sucha a za mokra při různých teplotách	30
4.3	Poměr LMW/HMW za sucha a za vlhka při různých teplotách.....	31
5.	DISKUZE	33
6.	ZÁVĚR.....	35
7.	SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ	36
8.	SEZNAM ZKRATEK	43

1. ÚVOD

Globální změny, zejména rychlý nárůst koncentrace oxidu uhličitého v atmosféře, mají vliv na růst rostlin a také na jejich pěstování. Zvyšující se koncentrace CO₂ v atmosféře má největší podíl na skleníkovém efektu. Důsledek skleníkového efektu je oteplování ovzduší, díky tomu pak tají ledovce a celková změna klimatu ovlivňuje všechno živé na Zemi. Z hlediska zabezpečení výživy rostoucí lidské populace je nutné monitorovat vliv globálních klimatických změn hlavně na zemědělské plodiny.

V dnešní době jsou cereálie jedním z hlavních zdrojů živin v lidské výživě. Na naší planetě se za rok vyprodukuje okolo 1,7 miliardy tun obilovin. Nejdůležitější obilovinou je pšenice, které se za rok vyprodukuje asi 640 miliónů tun. Z pšenice se získávají různé typy mouk, které jsou jednou z hlavních surovin pro výrobu základních potravin.

Kvalitu pšeničného těsta ovlivňuje mouka, z jaké bylo těsto vyrobeno. Kvalita mouky pak z velké míry závisí na kvalitě pšenice, ze které se ve mlýnech mouka mele. A kvalita vypěstované pšenice závisí na více faktorech, například na globálních podmínkách, na půdě, na odrůdě a na mnoha dalších. Téměř všechny podmínky jsou stabilní, právě až na globální změny klimatu, proto je nutné tyto změny a jejich vliv pečlivě zmapovat.

Kvalita pšeničného zrna, a tím i předpoklad pro to, jak bude kvalitní mouka, je z velké části dána pšeničnými proteiny. Hlavní bílkovinou v pšeničném zrně je lepek. Ten je tvořen především gluteniny a gliadiny. Tyto dvě složky udávají množství a kvalitu lepku. Lepek ve vodě tvoří nerozpustnou hmotu s elastickými vlastnostmi. Pšenice a následně i mouka z ní vyrobená má jako jediná obilnina ideální poměr gluteninů a gliadinů pro tvorbu elastického těsta, které je schopné se natahovat a kynout.

Předložená bakalářská práce se zabývá vlivem klimatických změn na kvalitu lepku, zejména na obsah gluteninů a na poměr gluteniny/gliadiny.

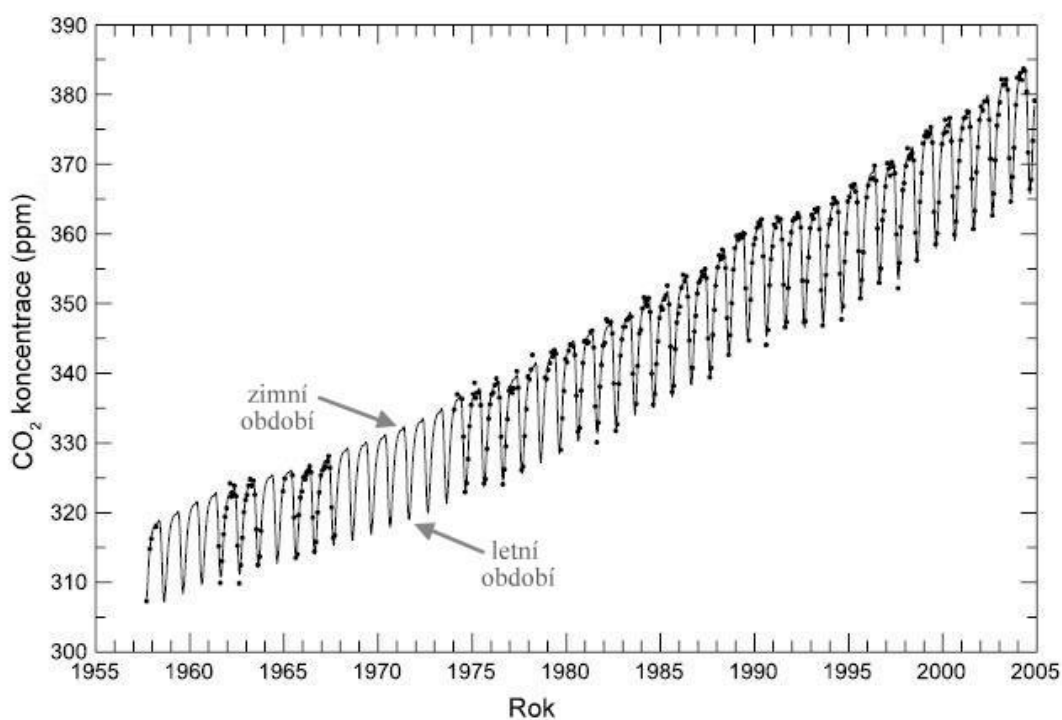
2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Globální klimatická změna

Změna klimatu je změna od průměrného stavu klimatu a jeho vlastností, která přetrvává po desítky let a více [1]. Změny klimatu jsou přirozeným jevem na naší planetě. Tento jev však nastával pomalu, v průběhu desítek až stovek tisíců let. Díky tomu bylo podnebí poměrně stabilní, a to přispívalo k rozvoji všech živých organismů.

Zhruba od začátku 20. století začali vědci pozorovat dlouhodobou odchylku od průměrných klimatických podmínek Země, tomuto jevu se říká globální klimatická změna [1]. Jednou z hlavních příčin, proč ke klimatickým změnám v dnešní době dochází, je zvyšující se množství skleníkových plynů v atmosféře. Rychlost, jakým se koncentrace těchto plynů zvyšuje je mnohokrát větší, než na jakou se dokáže příroda adaptovat [2].

Na obrázku 1 je znázorněn růst koncentrace CO_2 v průběhu posledních několika desítek let. Je zřejmé, že nárůst koncentrace CO_2 je poměrně velký a pokud se bude množství CO_2 takto zvyšovat i nadále, tak i průměrná teplota na naší planetě bude čím dál více stoupat.



Obrázek 1: Koncentrace CO_2 v atmosféře v letech 1957–2003 na Aljašce [3].

Veškeré výzkumy, které jsou prováděny, dospívají k téměř stejnému závěru a to, že s největší pravděpodobností je za změny globálního klimatu zodpovědný člověk [3]. Od začátku průmyslové revoluce se složení atmosféry výrazně změnilo. Tato proměna je způsobena velkým spalováním fosilních paliv, ale také kácením stromů [5][10]. Ty využívají CO_2 při fotosyntéze a dokáží tak snižovat množství vzdušného CO_2 , tím že ho vážou do organických sloučenin.

2.2 Skleníkový efekt

Tento efekt způsobují tzv. skleníkové plyny. Skleníkové plyny jsou: vodní pára, oxid uhličitý, metan, oxid dusný, freony a ozón [6]. Tyto plyny jsou sloučeniny, které díky svým fyzikálním vlastnostem propouštějí krátkovlnné záření horkých těles, a naopak pohlcují dlouhovlnné záření těles chladnějších, čímž sebe a okolí zahřívají. Ve skutečnosti to pak vypadá tak, že záření ze Slunce směrem k Zemi molekuly propustí a zpáteční záření, které se odrazilo od zemského povrchu, už molekuly těchto plynů nepropustí a zahřívá se tak okolní vzduch. Z tohoto tedy vyplývá, že čím větší je koncentrace skleníkových plynů v atmosféře, tak tím více se bude okolní ovzduší zahřívát. Čím více se zvyšuje teplota v ovzduší, tím více vody roztaje a následně i vypaří. Jelikož se i vodní pára podílí na skleníkovém efektu, tak se celý proces urychluje [7]. Největší vliv na oteplování má oxid uhličitý (asi 47 %), metan (27 %) a freony (10 %) [6]. Každý skleníkový plyn má jiné absorpční maximum, jak je vidět v tabulce 1 [11][12].

Tabulka 1: Hlavní absorpční pásma některých skleníkových plynů [12]

Skleníkový plyn	Vlnová délka absorpčního pásu [μm]
vodní pára	6,3 a 15–20
oxid uhličitý	4,3 a kolem 15; velmi účinné 12,9–17,1
metan	7–13
ozon	okolo 9,6 a 14,1
atmosférické okno	7–13

Kdyby v naší atmosféře žádné skleníkové plyny nebyly, tak by byla teplota na zemském povrchu o 33 °C nižší. Tudíž pro život na Zemi jsou skleníkové plyny nezbytné [1].

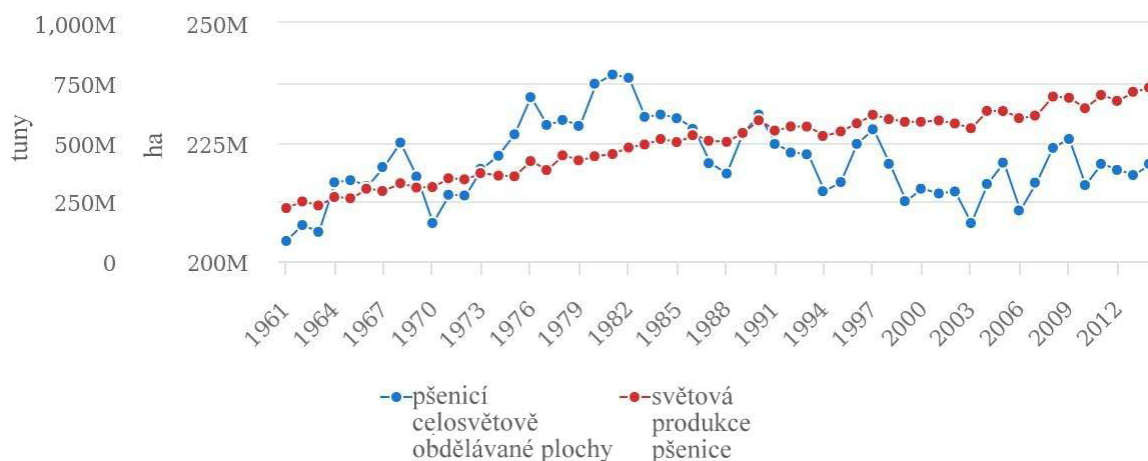
2.3 Vliv globální klimatické změny na rostliny

Přepokládá se, že globální klimatické změny ovlivní pěstování rostlin a přírodní vegetaci jako jsou lesy, louky a zemědělské plochy. Zvýšená teplota způsobuje rostlinám tepelný stres, který nemá příznivý vliv na jejich růst a ani rozmnožování. Trvalé nebo i přechodné vysoké teploty způsobují mnoho morfologických, fyziologických a biochemických změn, které ovlivňují růst a vývoj rostlin. Často pak také vedou k výraznému snížení ekonomického výnosu. Tepelný stres ovlivňuje vývoj rostlin, nelze však říci jednu teplotu, která je pro rostliny prahová. Tato teplota je značně ovlivněna vegetativním stadiem, ve kterém se právě rostlina nachází. Například při klíčení může vysoká teplota zpomalit nebo zcela pozastavit proces klíčení. To, jak vysoká prahová teplota pro jednotlivé rostliny v různých vegetativních fázích bude, ovlivňuje také druh a genetická výbava. Za účelem přežití tepelného stresu používají rostliny různé mechanismy a snaží se aklimatizovat. Při snaze se přizpůsobit začnou

rostliny přestavovat buňky, které byly postižené tepelným stresem. Dále dochází ke změnám metabolismu prostřednictvím aktivace genů, což způsobí, že rostliny začnou produkovat specifické stresové bílkoviny. Když je poškození buněk nevratné, pak dochází k tzv. eliminaci. I u obilovin dochází díky teplotnímu stresu k ovlivnění reprodukční fáze, což pak má za následek snížení výnosu. Studie ukazují, že reakce rostlin na vyšší teploty jsou různé. Záleží na genotypu, stadiu, ve kterém se rostlina nachází a také na druhu rostliny [8].

2.4 Význam pšenice

Jednou z nejdůležitějších, ne-li nejdůležitější, pěstovanou plodinou na naší planetě je pšenice. Právě tato plodina představuje nezastupitelný zdroj proteinů a energie pro více než třetinu obyvatelstva naší planety. Patří mezi základní suroviny potravinářského průmyslu a využívá se hlavně v pekárenském a těstářenském odvětví. Pšenice se pěstuje na všech kontinentech kromě Antarktidy a velikost plochy, na které se tato plodina pěstuje, meziročně roste. Od roku 1961, se množství vypěstované pšenice více jak ztrojnásobilo, jak je vidět na obrázku 2 [9].

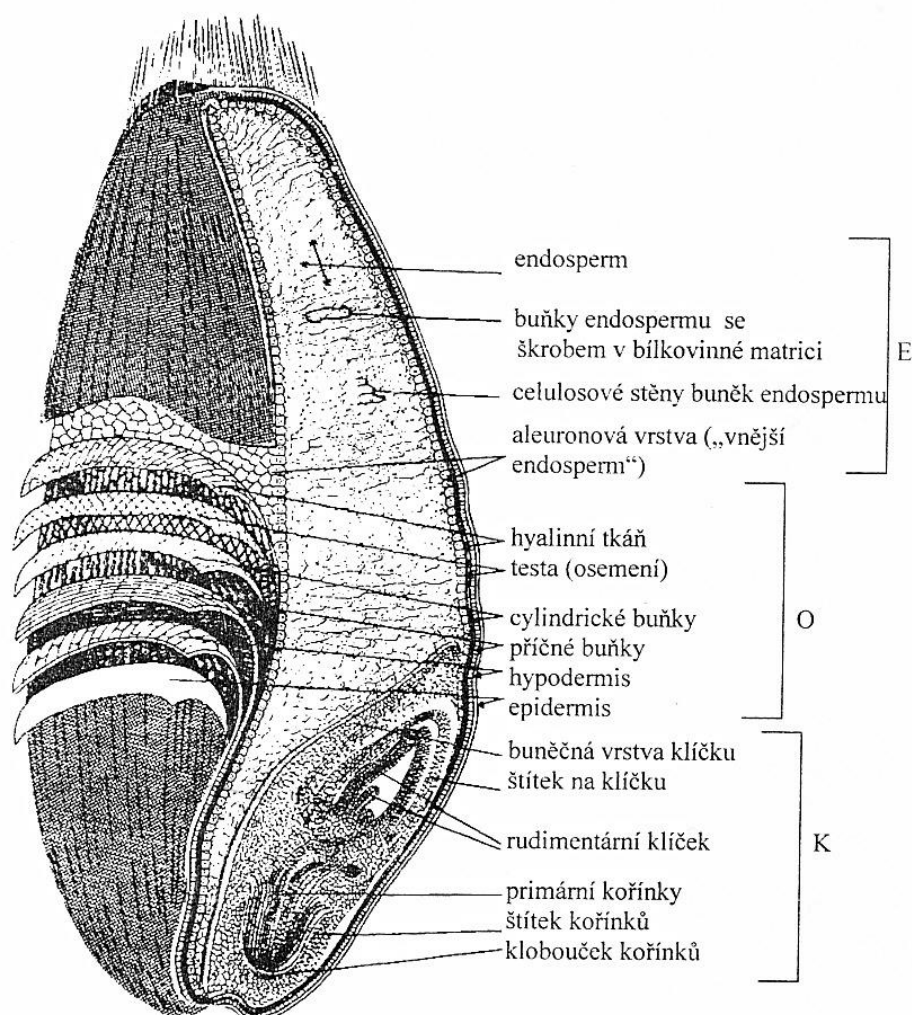


Obrázek 2: Produkce pšenice ve světovém měřítku mezi roky 1961–2014 [9]

Velké rozšíření pšenice je dáno jejími vlastnostmi a schopnostmi se přizpůsobit různým podmínkám. Rozemleté pšeničné zrnو se využívá jako hlavní ingredience při výrobě chleba, bílého pečiva a mnoha dalších pekářských výrobků. Dále se pak využívá k výrobě cereálií, kynutých pekárenských výrobků, pro které je pšeničná mouka jedinečná, cukrářských výrobků a mnoha dalších [13]. Roste také nepotravinářské využití pšenice. Odpady při výrobě mouky jako jsou otruby, pšeničné šroty nebo vysoko vymleté mouky, se pak využívají pro krmné účely hospodářských zvířat. Další z výhod pšenice a jiných obilovin, je jejich relativně snadné skladování a dlouhá trvanlivost [14]. Pšenice, žito a další obiloviny obsahují nerozpustné proteiny, které souhrnně nazýváme lepek. Jedinečnost pšenice oproti ostatním obilninám spočívá v jejím specifickém složení bílkovin, obsahem některých aminokyselin, ale hlavně viskoelastickými vlastnostmi lepku. Pšeničný lepek je tažný, žitný se naopak trhá. To je také důvod, proč se pšenici začala věnovat mimořádná pozornost. Na druhou stranu jsou lepkové bílkoviny častým původcem některých nemocí, alergií a intolerancí. Jednou

z nejznámějších chorob je celiakie. Jedná se o genetické onemocnění, které způsobuje chronické záněty tenkého střeva a ty mohou vést až k jeho trvalému poškození. Jedinci s touto vadou nemohou přijímat potravu, která obsahuje lepek [15][16].

2.5 Morfologie pšeničného zrna



Obrázek 3: Podélný řez pšeničným zrnem se znázorněním jeho morfologických vrstev. Vrstva, která přechází při mletí do otrub je značena O, do mouk značena E a vrstvy odstraňované s klíčkem K [14]

Vnější vrstvy pšeničného zrna chrání zrna před mechanickým poškozením. Říká se jim oplodí, jsou bohaté na vlákninu a minerální látky. Pod oplodím se nachází osemení, které při mletí také přechází do otrub, jak je vidět na obrázku 3. Tato vrstva obsahuje uvnitř svých buněk barvivo, které dává obilce výslednou barvu. Ještě více ke středu zrna se nachází vrstvy, které obsahují polysacharidické látky schopné vázat vodu. Tyto látky napomáhají k udržení rovnovážné vlhkosti zrna. Všechny tyto vnější obalové vrstvy se při mletí dostávají do otrub [17][18].

Uvnitř, pod obalovými vrstvami se nachází endosperm (jádru) a klíček (embryo), což je vidět i na obrázku 3. Klíček obsahuje velké množství bílkovin, lipidů, a minerálů, takže podléhá

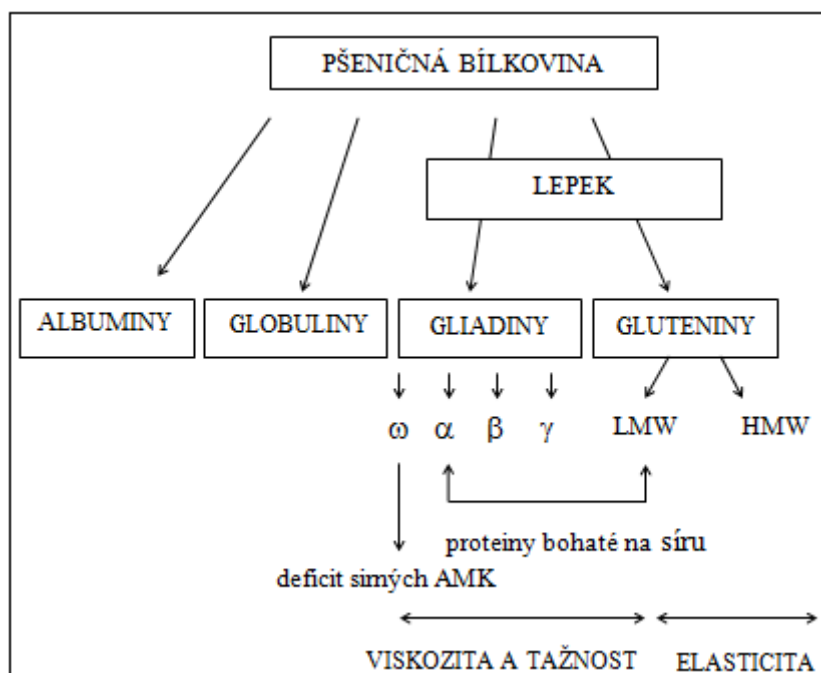
poměrně rychle oxidačním a enzymovým změnám. Vzhledem k tomu by výrazně zhoršoval kvalitu mouky, a proto se při mlýnském zpracování odstraňuje [17][14]. Dříve se klíčky ve mlýnech odstraňovaly takzvaným broušením, to se však již v dnešní době nevyužívá. Dnes se klíčky odstraňují až při samotném mletí. Je to až na tzv. luštění, kde primárním cílem není oddělení klíčků od jádra, ale získávání nejjakostnějších mouk [17].

Sušina endospermu je tvořena ze 75 % škrobem, 10–11 % tvoří proteiny a 3–4 % je vláknina. Endosperm obsahuje pouze velmi malé množství vitaminů a minerálních látek. Vnější vrstva endospermu, tzv. aleuronová vrstva je naopak na vitaminy a minerální látky bohatá, a kromě těchto látek obsahuje ještě bílkoviny a vlákninu. Tato vrstva při mletí z velké části odchází do otrub, aby nezvyšovala obsah popela v mouce. Stanovení obsahu popela v mouce je jedním z hlavních faktorů, který udává kvalitu mouky a stupeň vymletí zrna [14][17][18].

2.6 Pšeničné proteiny

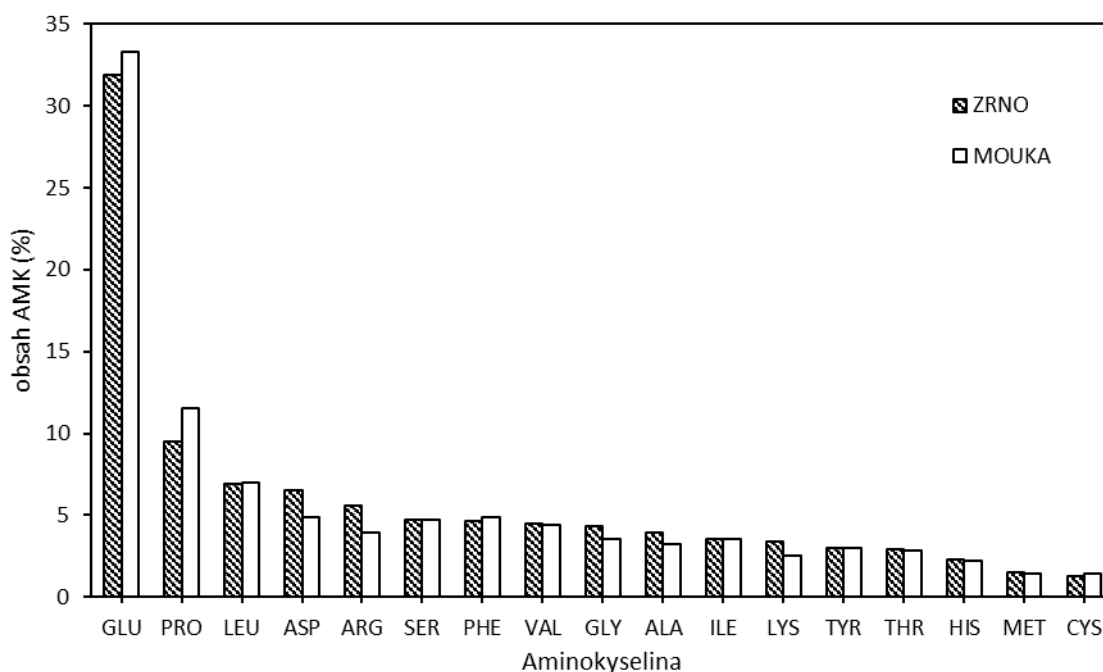
Kvalita mouky, potažmo kvalita a složení zrna, je dána několika okolnostmi, např.: genetickými vlastnostmi, podmínkami, ve kterých rostlina vyrůstala a stupněm vymletí mouky. Ve zralém pšeničném zrně se nachází okolo 10–15 % bílkovin, avšak tato hodnota je velmi závislá na mnoha faktorech a může kolísat [14][20].

Bílkoviny, které se nachází v zrně, se rozdělují podle rozpustnosti do několika kategorií. Grafické rozdělení je zobrazeno na obrázku 4. Albuminy jsou rozpustné ve vodě, globuliny ve zředěných roztocích solí, gliadiny ve vodném roztoku alkoholu a gluteniny jsou rozpustné v kyselých a alkalických roztocích [21][22]. Gliadiny a gluteniny spolu tvoří právě lepek. Je to asi 80 % všech pšeničných proteinů a jsou to více méně zásobní proteiny. Tyto lepkové bílkoviny se vyskytují výhradně v endospermu a mají zásadní vliv na kvalitu těsta připraveného z pšeničné mouky. Zbytek tvoří albuminy a globuliny, jež zastávají převážně metabolickou a strukturní funkci, a vyskytují se převážně v obalových vrstvách zrna. Tyto bílkoviny mají minimální vliv na kvalitu výsledného těsta. Někdy jsou v literatuře mezi bílkoviny řazeny i tzv. amfifilní proteiny vázané na lipidy, jež jsou obsaženy v buněčných membránách a hydrofobních vrstvách [23].



Obrázek 4: Dělení pšeničných bílkovin [19]

Základní aminokyseliny se vyskytují v téměř stejném množství napříč všemi obilovinami. Nejvíce je v pšenici obsažena kyselina glutamová, její obsah v zrně je okolo 32 % a v mouce pak přes 33 % z celkového množství aminokyselin. Struktura této aminokyseliny dává dobrý základ vzniku pružné prostorové bílkovinné struktury pšeničného těsta [17]. Procentuální zastoupení aminokyselin v zrně a v mouce je vidět na obrázku 5.



Obrázek 5: Obsah aminokyselin v pšeničném zrně a mouce [74]

2.6.1 Albuminy a globuliny

Albuminy a globuliny se vyskytují v obalových vrstvách zrna a představují 15–20 % z celkového obsahu bílkovin [24]. Řadí se mezi nelepkové bílkoviny. Z poloviny přispívají k celkovému obsahu lysinu, který je u obilovin limitní esenciální aminokyselinou [25]. Dále pak také obsahují ve větší míře arginin, histidin a methionin [26]. Jejich hlavním úkolem je ve formě enzymů katalyzovat metabolické procesy [29][27][28].

Albuminy v pšenici se nazývají leukosin. Jsou dobře rozpustné ve vodě a při teplotách nad 75 °C nevratně koagulují. Mají menší molekulovou hmotnost než 30 000 Da [24].

Globuliny v pšenici se nazývají edestin. Jsou nerozpustné ve vodě a rozpustné ve zředěných roztocích solí. Taktéž jako albuminy za tepla koagulují. V zrnech obilovin se vyskytují ve velmi malém množství [24][29].

2.6.2 Lepek a lepkové proteiny

První pšeničný lepek byl separován už v 18. století. Od té doby byl podroben mnoha výzkumům, a tak je v dnešní době celkem dobře prozkoumán [30][31].

Lepkové proteiny plní v rostlinách zásobní funkci. Kumulují se při fázi plnění zrna a jejich úkolem je, poskytovat dusík pro nově se vyvíjející se zárodek [29][32][54]. Dělíme je na dvě frakce podle rozpustnosti ve vodném roztoku alkoholu, a to na monomerní rozpustné gliadiny a polymerní nerozpustné gluteniny [23]. Obě tyto složky obsahují významné množství glutaminu a prolinu. Nejvíce se v lepku vyskytují α -, γ -gliadiny a nízkomolekulární gluteniny. Každá z těchto skupin bílkovin tvoří okolo 20–30 % lepku [23]. Odrůda a genetické vybavení mají velký vliv jednak na množství, ale také na poměr lepkových proteinů. Také dusíkaté hnojení má významný vliv na množství lepku a jeho složení [33].

Mokrý lepek se z pšeničné mouky získává vypíráním vodou. Přebytkovou vodu pak lze odstranit vymačkáním nebo odstředěním. Přitom dojde k odplavení škrobových zrn a dalších vodorozpustných látek. Zůstane nažloutlá elastická hmota, která v sušině obsahuje 75–85 % bílkovin a 5–10 % lipidů. Zbylé množství je pak složeno z malého množství minerálních látek, nevymytého škrobu a neškrobových sacharidů [38]. Díky lepku je těsto vyrobené z pšeničné mouky jedinečné. Zadržuje vodu, drží pospolu, a vzhledem k viskoelastické struktuře dokáže zadržovat kypřící plyny (jsou produkovány mikroorganismy při kynutí těsta), které způsobují nadýchanost a křehkost pečiva, což má zásadní význam z technologického hlediska [33][34][38].

Množství lepku a jeho kvalita je různá, proto byly stanoveny metody, díky kterým je možné určit tyto parametry [35]. Schopnost návratu těsta do původního stavu po působení síly, se nazývá pružnost těsta a je jedním z ukazatelů kvality lepku. Tuto vlastnost těstu dávají hydratované gliadiny. Dalším ukazatelem je roztážnost. Těsto se natahuje a posuzuje se schopnost těsta setrvat v koncové poloze bez potrhání struktury. Oproti pružnosti je roztážnost dána hydratovanými gluteniny [36][37]. Stručně řečeno je lepek podobný lepidlu, složenému ze dvou komponent. Gliadiny slouží jako plastifikátor a rozpouštědlo pro

gluteniny, a pouze jejich správný poměr dává těstu požadované technologické vlastnosti [32][38].

Poměrně důležitou součástí lepkových proteinů je aminokyselina cystein. I přes její nízký obsah (pouze 2 % ze všech aminokyselin) je velmi důležitá pro strukturu a funkčnost lepku. Tvoří disulfidické vazby, a to jednak uvnitř jednotlivých proteinů, tak i mezi jinými proteiny, které tak spojuje do řetězce. Právě disulfidické vazby jsou hlavními reakčními místy při redoxních reakcích, které probíhají při zrání zrna, mletí, přípravě těsta a pečení [38][39].

2.6.2.1 Gliadiny

Gliadiny vytváří nerozvětvené řetězce a pouze výjimečně tvoří agregáty. Gliadiny dělíme podle elektroforetické mobility v polyakrylamidovém gelu při kyselém pH na ty s největší mobilitou, což jsou α -gliadiny. Dále pak mobilita klesá v řadě β -, γ - a ω -gliadiny, které mají nejmenší mobilitu [32][40]. Jiné rozdělení je založeno na různých molekulárních hmotnostech a aminokyselinovém složení. Dělí gliadiny na ω 5-, ω 1,2-, α/β - a γ -gliadiny. Molekulární hmotnost α/β - a γ -gliadinů se pohybuje v rozmezí 28–35 kDa. ω 5-gliadiny mají molekulovou hmotnost okolo 49–55 kDa a ω 1,2-gliadiny pak mezi 39–44 kDa [38][41].

Gliadiny jsou rozpustné ve zředěných alkoholech. Obsahují velké množství prolinu a glutaminu. Zaujímají okolo 30–40 % z celkových pšeničných proteinů [30][39]. ω 5-gliadiny téměř vůbec neobsahují cystein, proto nemohou tvořit disulfidické můstky. Ostatní gliadiny cystein obsahují, a to jim umožňuje vytvářet disulfidické můstky uvnitř řetězce, což vede ke stabilizaci konformace [38].

2.6.2.2 Gluteniny

Jsou rozpustné ve slabých kyselinách a zásadách. Mají nevýznamnější vliv na pekárenskou kvalitu zrna, resp. mouky z něj umleté. Díky tomu jsou nejdůležitější složkou lepkové bílkoviny. Vylepšují bobtnavost, pružnost a pevnost těsta [42]. Patří k největším proteinům, které se vyskytují v přírodě. Jejich molekulová hmotnost je od 500 000 až po jednotky miliónů Da [32][38]. Kvalita gluteninové frakce je do značné míry dána geneticky. Je tvořena proteinovými podjednotkami, které dohromady tvoří vysokomolekulární zásobní pšeničné proteiny. Na jejich stavbě a prostorovém uspořádání se podílí vodíkové a disulfidické vazby, díky kterým tyto proteiny dosahují vysokých molekulových hmotností. Gluteniny lze elektroforézou rozdělit na vysokomolekulární gluteninové podjednotky (HMW) a nízkomolekulární gluteninové podjednotky (LMW). HMW podjednotky tvoří menšinový podíl gluteninů (asi 5–10 % z celkových proteinů), ale jejich technologický význam je velmi značný. Jejich molekulová hmotnost se pohybuje v rozmezí 80–150 kDa. Dávají kostru dlouhým polypeptidovým řetězcům stabilizovaným disulfidickými vazbami, což zvyšuje pevnost a pružnost lepku [43][44][45][46]. LMW podjednotky představují asi jednu třetinu z celkového množství peptidů v sušině zrna a asi 60 % z celkového obsahu lepku. Nabývají molekulové hmotnosti 30–51 kDa. Tyto podjednotky tvoří velké proteinové agregáty a mají velký vliv na pevnost těsta [44]. Na rozdíl od vysokomolekulárních podjednotek, které obsahují dva druhy disulfidických vazeb – intrařetězcové a interřetězcové (udržují pevnou

a pružnou strukturu), jsou nízkomolekulární podjednotky stabilizovány uvnitř molekuly disulfidickými a vodíkovými vazbami [14].

Vysokomolekulární podjednotky se dále dělí na dvě podskupiny. První podskupinu tvoří HMW s molekulovou hmotností 83–88 kDa a nazývají se x-HMW. Druhou podskupinou jsou HMW s molekulovou hmotností 67–74 kDa a říká se jim y-HMW [38]. x-HMW obsahují čtyři cysteiny, dva z nich jsou součástí intramolekulárních vazeb a zbylé vytváří disulfidické můstky mezi řetězci. Výjimkou je jednotka Dx5, ta obsahuje 5 cysteinů. y-HMW jsou mimo jiné složeny ze sedmi cysteinů, ale pouze u tří jsou známy vazby mezi řetězci [38][47]. Podjednotky typu x-HMW jsou důležitější než jednotky typu y-HMW, protože díky nim těsto získává požadované vlastnosti [48].

Další rozdělení gluteninů je založeno na rozdílné elektroforetické mobilitě v polyakrylamidovém gelu za přítomnosti dodecylsírany sodného. Podle tohoto hlediska se gluteniny dělí do čtyř skupin: A, B, C a D. HMW gluteninové podjednotky patří do skupiny A. Zbytek skupin jsou LMW podjednotky rozdělené podle molekulové hmotnosti. Do skupiny B se řadí LMW podjednotky o molekulové hmotnosti 42–51 kDa, do skupiny C patří podjednotky o molekulové hmotnosti 30–74 kDa a do skupiny D jsou zařazovány vysoce kyselé LMW gluteniny o molekulové hmotnosti 52–74 kDa [49].

Při zkoumání vlastností pšeničného těsta bylo zjištěno, že s lišícím se poměrem HMW/LMW se mění vlastnosti těsta, a to radikálním způsobem. Pokud je vyrobeno těsto z mouky, která nemá HMW podjednotky nebo jich obsahuje málo, pak má nedostatečnou tažnost. Z tohoto důvodu je pšenice tvrdá nevhodná pro pekařské účely, ale naopak vhodná pro výrobu těstovin [14][50].

2.7 Technologická jakost pšenice

Na kvalitu pšeničné mouky má největší vliv kvalita zpracovávaného zrna. Malou měrou se na jakosti mouky podílí i způsob mletí. Z toho vyplývá, že pokud má být umletá mouka kvalitní, tak zrno, ze kterého se mouka vyrábí, musí mít požadovanou kvalitu. Kvalita zrna je ovlivněna několika faktory: klimatickými podmínkami, pěstovanou odrůdou, kvalitou půdy, agrotechnikou (hnojení, ošetřování, sklizeň) a dalšími [51].

Potravinářská pšenice se dělí podle určených technologických parametrů na tyto kategorie [52]:

- pekárenská pšenice (vhodná pro výrobu kynutých těst)
- pečivářská pšenice (vhodná pro výrobu sušenek a keksů)
- pšenice pro speciální využití (výroba lihu a škrobu)
- pšenice krmná

V tabulce 2 jsou uvedeny hodnoty pro určení, zda bude pšenice spadat do kategorie pekárenská nebo pečivářská.

Tabulka 2: Hodnoty jakostních ukazatelů podle ČSN 46 1100-2 [53]

Jakostní ukazatele	pekárenská pšenice	pečivárenská pšenice
vlhkost v % (m/m)	nejvýše 14,0	nejvýše 14,0
objemová hmotnost v kg·hl ⁻¹	nejméně 76,0	nejméně 76,0
obsah dusíkatých látek v sušině v % (m/m)	nejméně 11,5	nejvýše 11,5
sedimentační index – Zelenyho test (SEDI) v ml	nejméně 30	nejvýše 25
číslo poklesu v s	nejméně 220	nejméně 220
příměsi celkem v % (m/m)	nejvýše 6,0	nejvýše 6,0
nečistoty celkem v % (m/m)	nejvýše 0,5	nejvýše 0,5

Další je dělení podle pekařské jakosti na třídu elitní (E), kvalitní (A), chlebovou (B) a nevhodnou pro výrobu kynutých těst (C) [51]. V tabulce 3 jsou uvedeny hodnoty, podle kterých se pšenice do těchto jakostních kategorií rozřazují. Pšenice spadá do takové kategorie, které odpovídá její nejhorší ukazatel kvality [54].

Tabulka 3: Minimální požadavky na rozřazení odrůd pšenice podle skupin jakosti [53]

Jakostní skupina	elitní – E		kvalitní – A		chlebová – B	
vyjádření hodnoty	absolutně	body (1–9)	absolutně	body (1–9)	absolutně	body (1–9)
objemová výtěžnost (ml)	530	8	500	6	470	4
obsah hrubých bílkovin (%)	12,6	6	11,8	4	11	2
Zelenyho test (ml)	49	7	35	5	21	3
číslo poklesu (s)	286	6	226	4	196	3
objemová hmotnost (g/l)	790	7	780	6	760	4
vaznost mouky (%)	55,4	7	53,2	5	52,1	4

2.7.1 Objemová výtěžnost (Rapid Mix Test)

Objemová výtěžnost pečiva se udává v ml pečiva na 100 g mouky. Je to hlavní kritérium při rozřazování pšenice do jakostních skupin E, A a B [55][56]. Tato metoda podává informace o kvalitě přítomných bílkovin, na rozdíl od různých analytických metod, kterými lze zjistit jejich množství. Provádí se tzv. pekařský pokus, kdy se simuluje výrobní proces. Těsto se velmi krátce a intenzivně hněte, pak se nechá krátce odležet, vytvaruje se na klonky a následuje pečení. Pro pečení jsou přesně definovány postupy a peče se za standardních podmínek. Konečný výrobek i těsto v průběhu přípravy prochází senzorickou kontrolou [56].

Z důvodu úspory nákladů se dnes používá MiniRMT [57]. Čím větší měrný objem je, tím vhodnější je pšenice vhodnější pro pekárenskou výrobu.

2.7.2 Obsah dusíkatých látek

Obsah dusíkatých látek neboli hrubé bílkoviny, je dalším parametrem, který se stanovuje při určování kvality zrna, respektive mouky. Obsah dusíkatých látek je zejména ovlivněn hnojením, podmínkami ročníku a odrůdou. Čím je obsah hrubé bílkoviny větší, tím kvalitnější těsto vznikne a poroste i objem konečných výrobků. Při klesajícím množství se snižuje kvalita lepku a tím také těsta [58].

Pro toto stanovení se využívá několik metod. Nejrychlejší je metoda blízké infračervené spektrometrie (NIR). Touto metodou lze stanovit i další složky v mouce, např.: popel, škrob, vlhkost, aj. [59]. Další způsob stanovení je Kjehldalova metoda podle ČSN ISO 1871 [60] nebo Dumasova metoda. Obsah dusíku v pšeničné mouce se pak přepočte na hrubou bílkovinu vynásobením faktorem 5,7 (faktor pro potravinářskou pšenici a mlýnské výrobky) [52].

2.7.3 Zelenyho sedimentační test

Dalším ukazatelem jakosti je Zelenyho sedimentační test podle ČSN ISO 5529 [54]. Touto metodou se určují kvalitativní viskoelastické vlastnosti lepku, které mají velký vliv na procesy v těstě během kynutí. Principem této zkoušky je schopnost lepku bobtnat v prostředí kyseliny mléčné o předepsané koncentraci. Tímto testem lze vyřadit takové odrůdy nebo partie zrna, které mají nízký obsah bílkovin nebo nekvalitní lepek. Dříve se také využívala metoda SDS, ta se ale v dnešní době již moc nepoužívá [51].

Podle přesně stanovených podmínek se připraví vzorek zkoumané mouky. Připraví se suspenze, která obsahuje vzorek mouky, kyselinu mléčnou, propan-2-ol a barvivo. Po přesně dané době, kdy se suspenze intenzivně protřepává a nechá v klidu stát, se určí objem sedimentu v ml [59].

2.7.4 Číslo poklesu (The Hagberg Falling Number)

Číslo poklesu neboli pádové číslo, je metoda, kterou se určuje úroveň poškození zásobních látek endospermu pšeničného zrna [55][56]. K poškození může dojít před nebo při sklizni, kdy vlivem nadměrné vlhkosti dojde k odstartování procesu klíčení. Takovému obilí, které začalo klíčit už na poli v klasech, se říká porostlé obilí. Porostlé obilí má nízké pádové číslo, protože jeho endosperm je štěpen vlastními enzymy α -amylasy [55]. Těsto vyrobené z mouky s nízkým pádovým číslem se lepí a těžce zpracovává. Výsledný produkt má malý objem a zeslabenou pružnost střídy pečiva.

Metoda pro stanovení je popsána v normě ČSN EN ISO 3093. Stanovení probíhá ve zkumavce, která je ponořena do vroucí vodní lázně a zjišťuje se rychlost mazovatění suspenze mouky a vody. To znamená, že když je mouka vyrobená z porostlého obilí, tak díky tomu, že α -amylasa začala štěpit škrob, je množství celkového škrobu menší. To se pak projeví tak, že vzniklý zmazovatěný škrob neklade při stanovení odpor viskozimetrickému míchadlu, a to

pak klesá zkumavkou rychleji. Číslo poklesu se rovná času (v sekundách), za který propadne míchadlo zkumavkou se vzorkem [56][61].

2.7.5 Objemová hmotnost

Objemová hmotnost se vyjadřuje jako hmotnost obilí v jednolitrové nádobě a udává se v g/l. Stanovení podléhá normě ČSN EN ISO 7971-3 [62]. Vypovídá o výtěžnosti obilí, což má význam pro mlýnské zpracování. Na objemovou hmotnost má velký vliv odrůda, pěstitelské podmínky, zdravotní stav a ročník [52].

2.7.6 Vaznost mouky

Vaznost mouky je z největší části ovlivněna obsahem hrubých bílkovin a bobtnavostí lepku. Menší mírou ji ovlivňují pentosany a poškozená škrobová zrna. Čím více jsou škrobová zrna mechanicky poškozená, tím více vody dokáží vázat [52]. Vaznost se stanovuje tzv. farinografickou zkouškou a postup stanovení je popsán v normě ČSN ISO 5530-1 [63].

Vaznost mouky udává, jaké množství vody je mouka schopna vázat. Hodnota se udává v procentech. Výsledky charakterizují výtěžnost a stabilitu těsta a jsou důležitým pekařským znakem [51].

2.7.7 Doplnková kritéria

Do doplňkových kritérií se řadí množství příměsí a nečistot, tvrdost zrna, hmotnost 1000 zrn, obsah popela v zrně pšenice, obsah mokrého lepku a výtěžnost mouky T-550.

Příměsí a nečistoty se většinou stanovují ručním tříděním. Všechny parametry, termíny a nároky jsou uvedeny v normě ČSN 46 1100-1 [64] a ČSN 46 1100-2 [53].

Množství popela v sušině zrna se stanovuje spalováním v peci nebo pomocí metody NIR. Toto stanovení podléhá normě ČSN ISO 2171 (46 10 19) [65].

Stanovení hmotnosti 1000 zrn se provádí tak, že se náhodně vybere 2×500 zrn, které se zváží, nebo se odváží určité množství zrn, ty se následně spočítají a hmotnost se přepočítá na 1000 zrn [54].

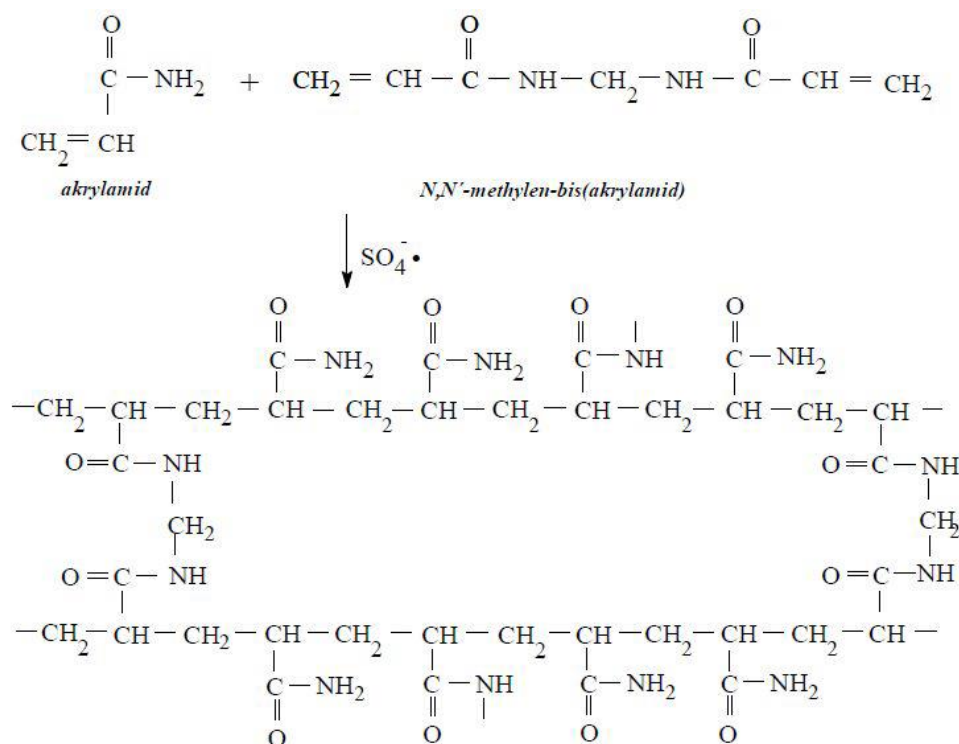
Obsah mokrého lepku se stanovuje ručním vypíráním. Ten se následně zváží a přepočítá se na procentuální množství mokrého lepku v sušině mouky [59][66].

Výtěžnost mouky se stanovuje mlecím pokusem. Patří mezi významná mlynářská kritéria [67].

2.8 Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu – SDS-PAGE

K velmi často využívaným metodám pro stanovení pšeničných proteinů patří právě elektroforetické techniky. Obecným principem těchto technik je, že se molekuly separují průchodem gelovou maticí podle velikosti, ale také podle velikosti jejich náboje ve stejnosměrném elektrickém poli [68][69]. Dalším faktorem, který hraje roli při separaci molekul, je síťový efekt [71]. Velké molekuly se díky tomu pohybují pomaleji než malé, protože bílkoviny, které mají podobnou velikost jako póry, tak jsou zachycovány a tím se

jejich pohyb zpomaluje. Velmi často využívaná elektroforetická technika je elektroforéza v polyakrylamidovém gelu, protože je rychlá, levná a umožňuje pracovat s velmi malým množstvím proteinů. Polyakrylamidový gel je inertní, mechanicky pevný, průhledný a transparentní [70].



Obrázek 6: Struktura polyakrylamidového gelu [71]

Nejvíce využívanou metodou pro separaci bílkovin je SDS-PAGE. Tato elektroforéza využívá dodecylsírán sodný (SDS), který dává proteinům stejný záporný náboj a eliminuje tak vlastní náboj proteinu. Po vytvoření komplexu SDS-protein získají molekuly obdobný válcovitý tvar a díky tomu se pak bílkoviny dělí na základě různých molekulových hmotností [73]. Jsou rozštěpeny jejich vodíkové můstky i disulfidické vazby a řetězce jsou nataženy. Nejvíce využívaná redukční činidla pro redukci disulfidických vazeb jsou dithiohreitol (DTT) nebo 2-merkapt ethanol. Jejich působením dojde k rozdělení bílkovin na jednotlivé podjednotky, které se následně separují a vytvoří v gelu zóny, seřazené podle molekulové hmotnosti [73]. Přídavkem SDS a redukčního činidla jsou však proteiny denaturovány, a tak tato metoda neposkytuje informace o nativním stavu bílkovin [71].

Metoda je vhodná pro stanovení všech lepkových proteinů, ale nejvíce je využívána pro stanovení gluteninů. Nevýhodou metody je nutnost barvení kvůli vizualizaci zón, nesnadná kvantifikace a také to, že se používá akrylamid, který má toxické účinky [72]. Ke kvantitativnímu vyhodnocování gelů se s nástupem molekulární biologie začala využívat počítačová denzitometrie (podrobněji viz kapitola 3.3).

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Cílem experimentální části této práce bylo zjistit množství gluteninů a gliadinů ve zkoumaných vzorcích pšenice metodou SDS-PAGE. Především poměr, těchto dvou frakcí udává, jak kvalitní bude mouka získaná z pšeničného zrna.

3.1 Materiál – vzorky

Experiment byl navržen a proveden pracovníky Ústavu výzkumu globální změny Akademie věd České republiky, ve spolupráci s Mendelovou univerzitou. Pro experiment byly použity dva genotypy pšenice seté: Pannonia a RGT Reform (v práci dále označovaný jako RGT). Experiment začal v říjnu 2014, kdy bylo osivo zasazeno do speciálních černých nádob. Nádoby měly rozměry $10,5 \times 10,5 \times 21,5$ cm a do každé byla zasazena dvě zrna. Půda, která byla pro tento experiment použita, pocházela z experimentální stanice v Polkovicích na Moravě a byla klasifikována jako luviská černozem s půdotvorným substrátem spraš. V hale Mendelovy univerzity byly nádoby vystaveny okolním meteorologickým podmínkám až do dosažení fáze naduřování horní listové pochvy, která následně přechází ve fázi metání. Okolo nádob byl použit keramzit, jako ochrana proti mrazu. Hnojení vodným roztokem dusičnanu amonného o koncentraci 0,29 g dusičnanu na 14 ml vody na jednu nádobu, proběhlo v březnu 2015. Dále byly vzorky ošetřeny insekticidy a fungicidy. V květnu 2015 byly vzorky převezeny do Ústavu globální změny AV ČR. Zde byly vloženy do speciálních kultivačních komor, kvůli aklimatizaci na jednotlivé teploty.

V období kvetení byly, pro možnost hodnocení vlivu nedostatku půdní vláhy a vysoké teploty, v jednotlivých komorách simulovány tepelné stresové podmínky s teplotními maximy při 26 °C, 32 °C a 38 °C.

Tabulka 4: Podmínky v kultivačních komorách. První tři sloupce ukazují průběh denních teplot v komorách K1, K2, K3, FAR je fotosynteticky aktivní radiace a RV je relativní vlhkost.

Čas	K 1 t (°C)	K 2 t (°C)	K 3 t (°C)	FAR ($\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)	RV (%)
0:00	20	20	20	0	85
4:00	18	18	18	0	90
6:00	18	18	18	0	90
12:00	26	32	38	1500	45
14:00	26	32	38	1500	45
20:00	22	22	22	0	75
24:00	20	20	20	0	85

V tabulce 4 jsou uvedeny podmínky v jednotlivých komorách. Pro vzorek, který byl vystaven stresu suchem, byla vlhkost půdy udržována pod 30 %. Druhá varianta, byla zalévána tak, aby vlhkost půdy neklesla pod 70 %. 14 dní byly rostliny vystavovány tomuto stresovému režimu

a pak byly následně vyjmuty z komor a umístěny ven, kde byly vystaveny aktuálnímu počasí. Po dozrání a sklizni byla získaná zrna rozemleta na mouku. Zpracování vzorků je popsáno v dalších kapitolách experimentální části této bakalářské práce.

3.2 Stanovení obsahu gluteninů metodou SDS-PAGE

3.2.1 Přístroje

Analytické váhy HR-120-EC, firma A&D INSTRUMENTS LTD

Centrifuga 5430 R, firma EPPENDORF

Vortex – Stuart, firma MERCI

Vortex – Genie 2, firma SCIENTIFIC INDUSTRIES, INC.

Termoblok TDB-100, firma BIOSAN

Lednice s mrazicí částí, firma GORENJE

Aparatura pro elektroforézu Mini PROTEAN, firma BIO-RAD

Zdroj Power Pac HC, firma BIO-RAD

Třepačka KS 130 BASIC, firma IKA

3.2.2 Chemikálie

Akrylamid (SIGMA ALDRICH)

N,N'-Methylenbisakrylamid (SIGMA ALDRICH)

Coomasie Brilliant Blue G-250 (SERVA)

Bromfenolová modř Na sůl (SERVA)

Butanol (LACH-NER)

DTT – dithiothreitol (SIGMA ALDRICH)

Ethanol

Glycerol (SIGMA ALDRICH)

Glicin (SIGMA ALDRICH)

Isopropanol (LACH-NER)

Kyselina chlorovodíková (LACH-NER)

Kyselina octová (SIGMA ALDRICH)

Methanol (SIGMA ALDRICH)

Peroxodisíran amonný (SIGMA ALDRICH)

SDS-dodecylsulfát sodný (SIGMA ALDRICH)

TEMED – N,N,N',N'-tetramethylethyldiamin (SIGMA ALDRICH)

TRIS – tris(hydroxymethyl)aminomethan (SIGMA ALDRICH)

NaCl – chlorid sodný (SIGMA ALDRICH)

3.2.3 Příprava roztoků

Roztok A: 29,2 g akrylamidu a 0,8 g bisakrylamidu bylo kvantitativně převedeno do odměrné baňky na 100 ml. Baňka byla doplněna destilovanou vodou po rysku. Roztok se uchovává v lednici při teplotě 4 °C.

Roztok B: V kádince bylo v 75 ml destilované vody rozpuštěno 18,16 g TRIS. Po dokonalém rozpuštění bylo upraveno pH na hodnotu 8,8 koncentrovanou HCl. Roztok byl následně převeden do odměrné baňky na 100 ml a doplněn destilovanou vodou po rysku. Roztok se uchovává v lednici při teplotě 4 °C.

Roztok C: V kádince bylo v 75 ml destilované vody rozpuštěno 18,16 g TRIS. Po dokonalém rozpuštění bylo upraveno pH na hodnotu 6,8 koncentrovanou HCl. Roztok byl následně převeden do odměrné baňky na 100 ml a doplněn destilovanou vodou po rysku. Roztok se uchovává v lednici při teplotě 4 °C.

Roztok D: Do odměrné baňky na 100 ml bylo kvantitativně převedeno 10 g SDS a baňka byla doplněna destilovanou vodou po rysku. Roztok se uchovává bez přístupu světla při laboratorní teplotě.

Roztok E: 0,1 g peroxodisíranu amonného bylo rozpuštěno v 1 ml destilované vody. Tento roztok se musí připravovat čerstvý před každým stanovením.

TEMED: komerčně dodávaný roztok

Elektrodový roztok: 12 g TRIS, 4 g SDS a 37,6 g glycinu bylo rozpuštěno ve 2 000 ml destilované vody. Roztok se používá opakovaně a uchovává se v lednici při 4 °C.

1% vodný roztok NaCl: 1 g NaCl byl kvantitativně převeden do odměrné baňky na 100 ml a rozpuštěn. Baňka byla doplněna destilovanou vodou po rysku.

50% vodný roztok propanolu: Propanol byl smíchán v poměru 1:1 s destilovanou vodou. Roztok se uchovává za laboratorní teploty.

Roztok pro extrakci gluteninů: 0,97 g TRIS bylo kvantitativně převedeno do kádinky, která obsahovala 80 ml 50% propanolu a navážka byla rozpuštěna. Po upravení pH na hodnotu 8,0 koncentrovanou HCl byl roztok z kádinky kvantitativně převeden do odměrné baňky na 100 ml a baňka byla doplněna po rysku 50% propanolem. Před každým stanovením bylo rozpuštěno v 15 ml tohoto roztoku 0,15 g DTT. Tento roztok se musí vždy před každým stanovením připravit čerstvý. Krok s přidáním DTT se provádí těsně před použitím extrakčního roztoku. Roztok bez přídavku DTT se uchovává v lednici při teplotě 4 °C.

Vzorkový pufr: Do kádinky bylo kvantitativně převedeno 2 g SDS, 40 ml glycerolu, 0,02 g bromfenolové modře, 0,97 g TRIS. Vše bylo dokonale rozpuštěno za malého přídavku destilované vody. Po upravení pH na hodnotu 8,0 koncentrovanou HCl byl roztok

kvantitativně převeden z kádinky do odměrné baňky na 100 ml a baňka byla doplněna vodou po rysku. Roztok se uchovává v lednici při teplotě 4 °C.

Stabilizační roztok: Bylo smícháno 150 ml methanolu a 600 ml vody. Roztok se používá opakovaně a uchovává se za laboratorní teploty.

Barvicí roztok: Bylo smícháno 0,5 g Coomassie Blue G-250, 450 ml ethanolu, 100 ml koncentrované kyseliny octové a 450 ml vody. Roztok se používá opakovaně a uchovává se za laboratorní teploty.

Odbarvovací roztok: Bylo smícháno 250 ml methanolu, 100 ml koncentrované kyseliny octové a 650 ml vody. Roztok se uchovává za laboratorní teploty.

3.2.4 Příprava vzorků

Do mikrozkuhavky Eppendorf o objemu 1,5 ml bylo naváženo 30 mg vzorku pšeničné mouky. K navážce byl přidán 1 ml 1% roztoku NaCl a mikrozkuhavka se protřepávala po dobu 30 minut na vortexu Genie 2. Poté byla suspenze odstředěna při 10 000 g po dobu 1 minuty. Supernatant byl slit a sediment byl ještě jedenkrát extrahován 1% roztokem NaCl stejným postupem. Tímto způsobem se ze vzorku mouky vyextrahovaly albuminy a globuliny. Dalším krokem bylo vyextrahovat ze sedimentu gluteniny. Byl přidán 1 ml extrakčního roztoku pro gluteniny, sediment byl důkladně rozmíchán a směs byla inkubována v termobloku po dobu 30 minut při 65 °C. Každých 10 minut byla směs v mikrozkuhavce rychle a intenzivně promíchána. Po inkubaci byla suspenze odstředěna při 10 000 g po dobu 5 minut. 0,3 ml supernatantu bylo odpipetováno do čisté mikrozkuhavky Eppendorf o objemu 1,5 ml a k tomu bylo přidáno 0,3 ml vzorkového pufru. Mikrozkuhavka s extraktem byla opět krátce a intenzivně protřepána. Poté byla vložena do termobloku, kde byla inkubována 15 minut při 65 °C. Takto připravené extrakty byly uchovávány v mrazáku při teplotě -18 °C.

3.2.5 Příprava gelů

Elektroforetická skla byla pečlivě omyta vodou a prostředkem na mytí nádobí. Poté byla opláchnuta destilovanou vodou a odmaštěna ethanolem. Skla byla připevněna do stojánku tak, aby větší sklo bylo vzadu. Spodní strana skel byla shora zamáčknuta do pěnové podložky, tak aby nedošlo k vytečení gelu. Na stanovení byly použity 10% separační gel a 5% zaostřovací gel.

3.2.5.1 Separační gel

Do kádinky byly automatickými pipetami odměřeny objemy roztoků podle tabulky 5.

Roztoky E a TEMED byly přidány současně. Musí se přidávat těsně před nalitím mezi skla, protože roztok rychle tuhne. Nadávkované roztoky v kádince byly pečlivě promíchány a připravený roztok byl nalit mezi skla asi 1,5 cm od horního okraje skla. Zbytek roztoku byl ponechán v kádince pro kontrolu ztuhnutí gelu. Na roztok mezi skly byla nalita vrstva butanolu o šířce asi 5 mm. Butanol se přidává, protože vyrovná hladinu gelu, rozruší všechny bublinky a funguje také jako ochrana proti vypařování vody. Gely byly po dobu tuhnutí

průběžně kontrolovány, jestli nějakou mezírkou nevytéká roztok pryč. Po 1 hodině, kdy separační gel ztuhl, byl butanol slit a gel byl promyt destilovanou vodou. Voda, která zůstala mezi skly, byla odsána buničinou.

Tabulka 5: Objemy roztoků k přípravě 10% separačního gelu

Roztok	Objem [ml]
destilovaná voda	11,9
A	10,0
B	7,5
D	0,3
E	0,3
TEMED	0,012

3.2.5.2 *Zaostřovací gel*

Do kádinky byly automatickými pipetami odměřeny objemy roztoků podle tabulky 6.

Tabulka 6: Objemy roztoků k přípravě 5% zaostřovacího gelu

Roztok	Objem [ml]
destilovaná voda	6,8
A	1,7
C	1,25
D	0,1
E	0,1
TEMED	0,01

Roztoky E a TEMED byly přidány současně. Musí se přidávat těsně před nalitím mezi skla, protože roztok rychle tuhne, stejně jako u separačního gelu. Roztok v kádince byl pečlivě promíchán a rovnoměrně nalit na ztuhlý separační gel až po okraj skel. Do prostoru mezi skly byl ihned ponořen elektroforetický hřebínek tak, aby se v gelu nevytvořily žádné bublinky. Nejdříve po 45 minutách, kdy zaostřovací gel tuhne, je možné hřebínek vyjmout. Hotový gel je možné uchovávat v lednici, avšak nejdéle do druhého dne. Hřebínek brání vysychání gelu, proto je dobré jej vyjmout až těsně před nanášením vzorku.

3.2.6 Elektroforéza

Elektroforetické hřebínky byly opatrně odstraněny ze skel, tak aby se neporušil ztuhlý gel. Skla byla očištěna od zbytků gelu, promyta destilovanou vodou a upevněna do stojanu na elektroforézu větším sklem ven. Stojan byl vložen do elektroforetické nádoby. Vnitřní prostor stojanu (mezi skly) byl až po okraj naplněn elektrodoým roztokem a vnější prostor byl

naplněn po rysku na vaně. Vzorky byly vyndány z mrazáku a byly ponechány asi 10 minut při laboratorní teplotě, dokud neroztály. Následně byly mikrozkušavky se vzorky před dávkováním na gely odstředěny při 10 000 g po dobu 2 minut, pro usazení sraženin, které by mohly bránit bílkovinám v průchodu gelem. Automatickou pipetou s dlouhou špičkou byly nadávkovány odstředěné vzorky do jamek na gelech v množství 5 μ l. Takto připravená aparatura byla připojena ke zdroji a byla spuštěna elektroforéza. Prvních 10 minut probíhala při konstantním napětí 50 V, a po uplynutí této doby bylo napětí zvýšeno na 100 V a elektroforéza probíhala dalších 110 minut. V průběhu elektroforézy bylo nezbytné kontrolovat, zda elektrodový roztok neprotéká z prostoru mezi skly do vany. Pokud ano, tak musel být průběžně doplňován.

3.2.7 Vizualizace bílkovin

Po ukončení elektroforézy byla elektroforetická skla s gely vyndána ze stojanu, tak aby roztok odtékl do elektroforetické vany. Poté byla skla ponořena do misky s destilovanou vodou a pomocí umělohmotné špachtle byly skla od sebe opatrně odděleny. Gel byl pod vodou jemně sejmut a uvolněn do destilované vody. Voda z misky byla vylita a místo ní byl nalit stabilizační roztok v takovém množství, aby byly všechny gely ponořeny a mohly se volně pohybovat. Miska byla položena na třepačku, ta byla následně zapnuta a po dobu 5 minut se gely stabilizovaly. Poté byl stabilizační roztok slit zpět do zásobní lahve a místo něj byl nalit barvicí roztok, který byl protřepáván 30 minut na třepačce. Po uplynutí této doby byl roztok v misce opět vyměněn, tentokrát za odbarvovací roztok. A po dobu 90 minut byly gely znovu promývány na třepačce. Po slití odbarvovacího roztoku byla do misky nalita destilovaná voda a gely byly pořádně promyty. Následně byly položeny na větší elektroforetická skla, tak aby ležely na hladké straně a výstupky po stranách, aby směřovaly dolů. Poté byla skla i s gely zabalena do potravinářské folie, která chránila gely před vysycháním. Takto připravené gely byly uchovávány v lednici při 4 °C. Při práci s gely bylo nutné po celou dobu používat ochranné gumové rukavice z důvodu vysoké toxicity akrylamidu.

3.3 Vyhodnocení gelů

Hotové gely byly naskenovány a kvantifikace jednotlivých bandů byla provedena počítačovou denzitometrií (program FUJIFILM, Science Lab 2006, Multi Gauge, verze 3.1). Zóny jednotlivých podjednotek byly převedeny na píky a integrací byla vypočítána jejich plocha. Kvůli nedostupnosti standardu nebylo možné přepočítat tyto plochy píků na koncentraci. Pro porovnávání jednotlivých variant byly tedy použity příslušné plochy píků.

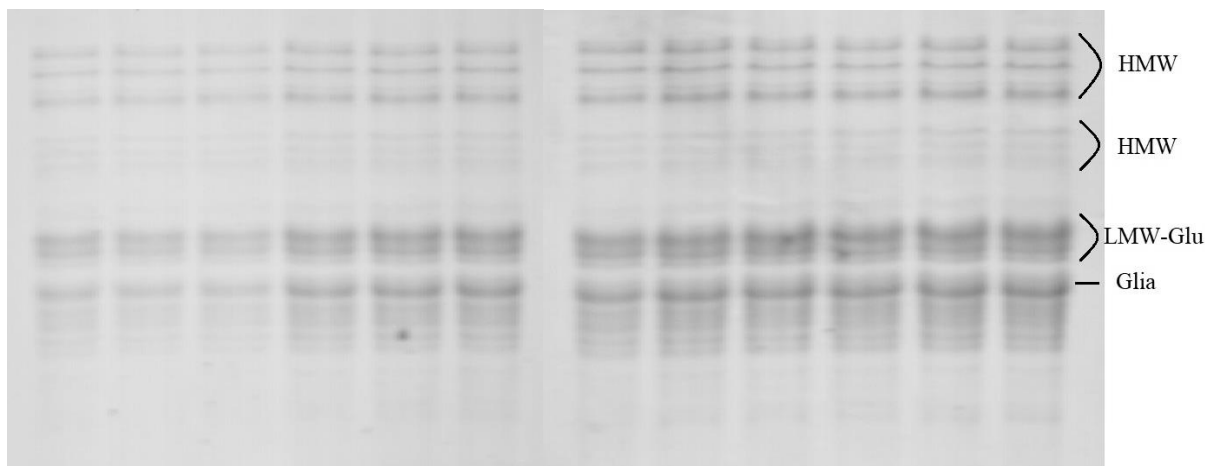
3.4 Statistické zpracování výsledků

Statistické zpracování dat bylo provedeno v programu MS Excel. Každý vzorek byl třikrát proměřen a z těchto hodnot byla získána průměrná hodnota. Výsledky byly graficky zpracovány ve formě sloupcových grafů s chybovými úsečkami, které znázorňují směrodatnou odchylku.

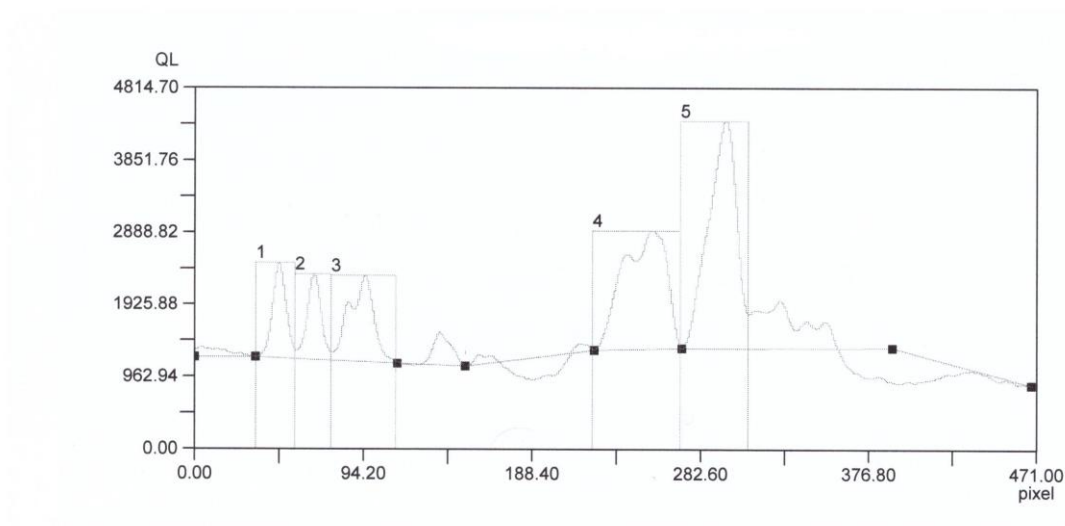
4. VÝSLEDKY

Metodou SDS-PSGE byly analyzovány dvě odrůdy pšenice, a to Pannonia a RGT Reform. Na obrázku 7 lze vidět gely, které byly získány při vypracovávání praktické části této práce. Konkrétně jde o gely, které byly získány při provádění kalibrace metody, tzn byla zjišťována ideální velikost navážky, při které je ještě možné od sebe zóny dobře rozeznat a při které je ještě lineární závislost koncentrace na intenzitě zón.

Převedení jednotlivých zón na píky, které byly podrobeny dalšímu zpracování, je možné vidět na obrázku 8 a 9.



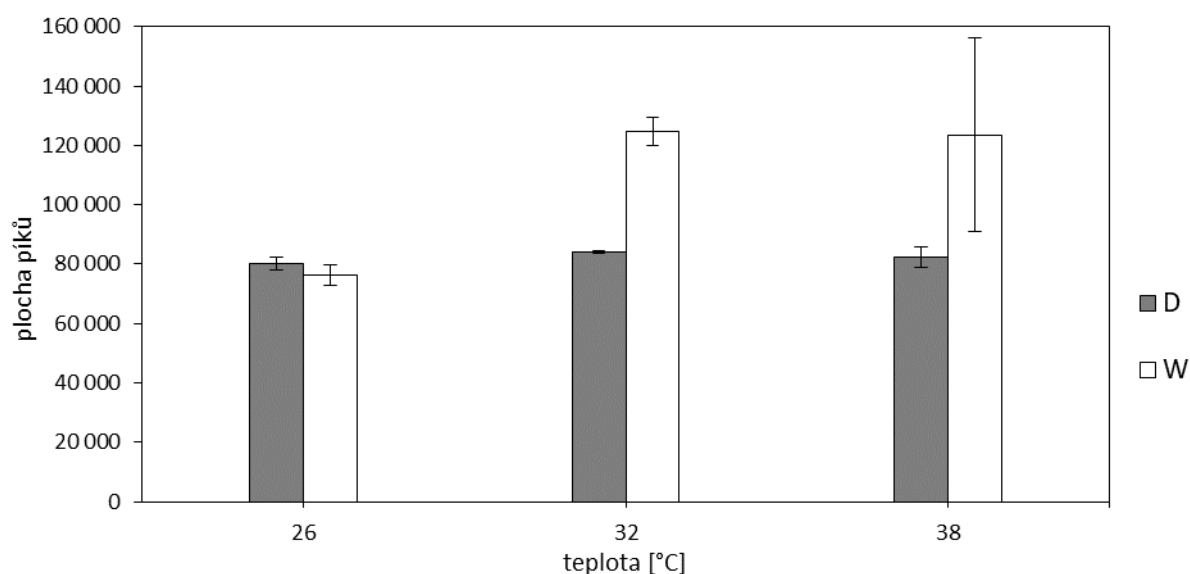
Obrázek 7: Ukázka gelů získaných metodou SDS-PAGE s popisem jednotlivých frakcí. Velikost navážky rostla od 25 mg (3 sloupce úplně vlevo) po 25 mg až do největší navážky, která byla 100 mg (3 sloupce úplně vpravo)



Obrázek 8: Ukázka elektroforegramu z analýzy odrůdy Pannonia

4.1 Celkový obsah gluteninů při kultivaci za sucha a za mokra při různých teplotách

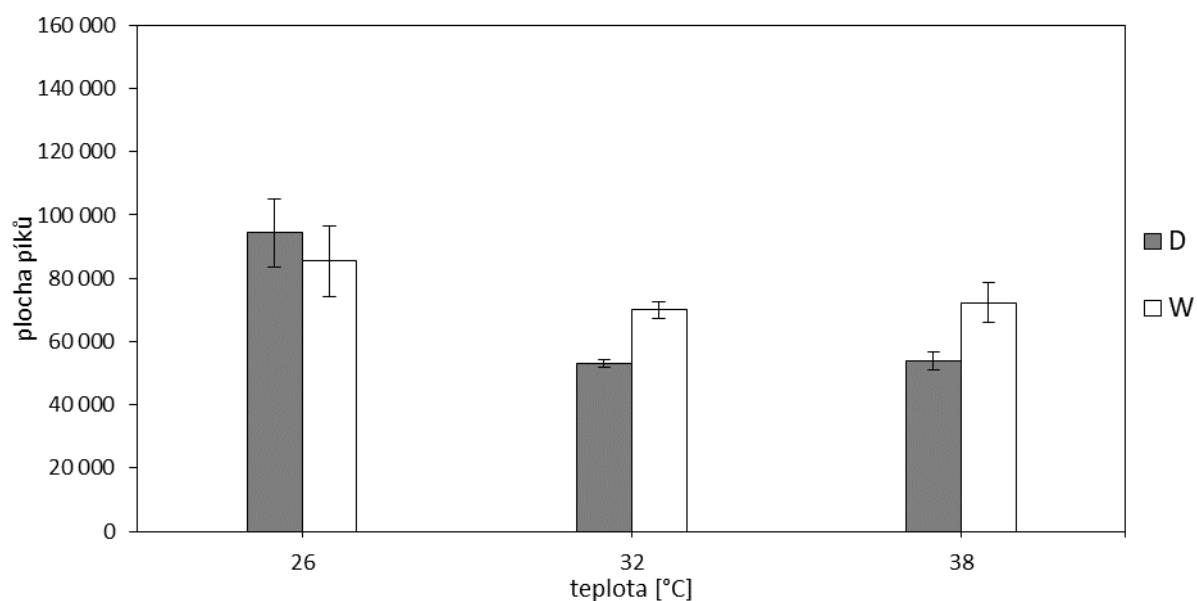
Pannonia



Obrázek 9: Srovnání celkového obsahu gluteninů při kultivaci za sucha (D) a za vlhka (W) odrůdy Pannonia při třech kultivačních teplotách

Při porovnávání celkového obsahu gluteninů u odrůdy Pannonia (obrázek 9) lze vidět, že teplota kultivace ovlivňuje obsah gluteninů pouze při pěstování za vlhka. Při kultivaci za sucha se obsah celkových gluteninů vlivem teploty takřka nezměnil, je tedy zřejmé, že sucho bylo v tomto případě limitujícím faktorem. Při kultivaci za vlhka byl obsah gluteninů asi o 39 % vyšší při teplotě 32 °C ve srovnání s teplotou 26 °C, dále však už obsah gluteninů vlivem teploty nerostl. Při vyšších teplotách byl obsah gluteninů u zavlažované varianty asi o 33 % vyšší ve srovnání s rostlinami stresovanými suchem.

RGT



Obrázek 10: Srovnání obsahu gluteninů při kultivaci za sucha (D) a za vlhka (W) odrůdy RGT Reform při třech kultivačních teplotách

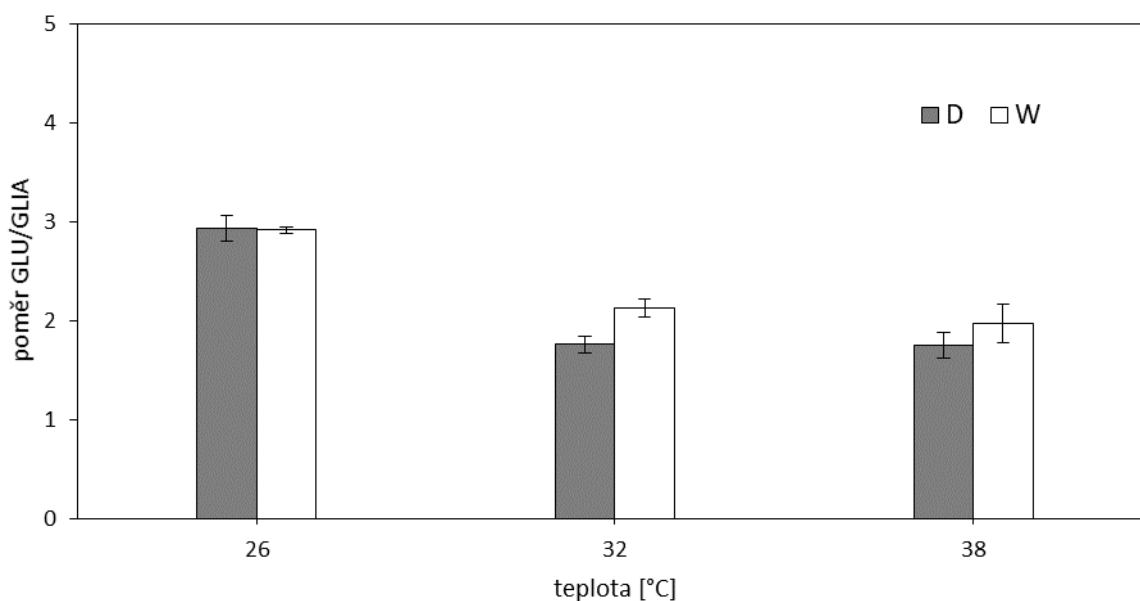
U odrůdy RGT (obrázek 10) byl prokázán vliv jak teploty kultivace, tak i vliv sucha a vlhka. Nejvyšší obsah gluteninů v zrně byl zjištěn při teplotě pěstování 26 °C. Při dalších dvou teplotách byl obsah gluteninů menší – u suché varianty asi o 25 %, u zavlažované o 16 %.

Při vyšších teplotách je obsah gluteninů u zavlažovaných rostlin o 25 % vyšší než u rostlin stresovaných suchem. Je vidět, že sucho v interakci s vyšší teplotou je limitujícím faktorem.

Při porovnání jednotlivých odrůd mezi sebou (obrázky 9 a 10), lze pozorovat, jak odlišně reagují tyto dvě odrůdy na rostoucí teplotu kultivace. Zatímco Pannonia produkovala více gluteninů při vyšších teplotách a to 32 a 38 °C, u RGT tomu bylo přesně naopak. Na nedostatek vláhy reagovaly obě odrůdy podobně.

4.2 Poměr obsahu celkových gluteninů k obsahu gliadinů při kultivaci za sucha a za mokra při různých teplotách

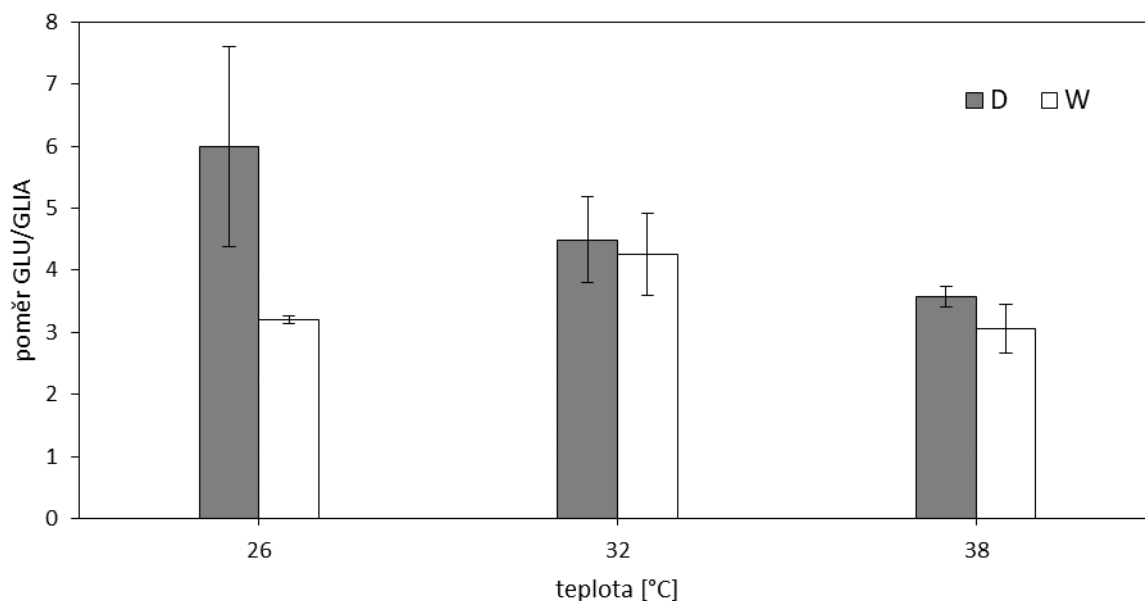
Pannonia



Obrázek 11: Poměr obsahu gluteninů k gliadinům odrůdy Pannonia při třech kultivačních teplotách za sucha (D) a za vlhka (W)

Obrázky 11 a 12 ukazují, že poměr obsahu gluteninů k obsahu gliadinů vykazoval silnou závislost na odrůdě. V našem případě odrůda RGT měla při všech teplotách vyšší poměr gluteniny/gliadiny než Pannonia. Dále poměr gluteniny/gliadiny závisel na teplotě; u obou odrůd se stoupající teplotou klesal, přičemž tento pokles byl větší u RGT a za sucha. Vliv sucha na poměr gluteniny/gliadiny byl u Pannonie a RGT rozdílný. U Pannonie sucho snižovalo obsah gluteninů vzhledem ke gliadinům, u RGT tomu bylo naopak.

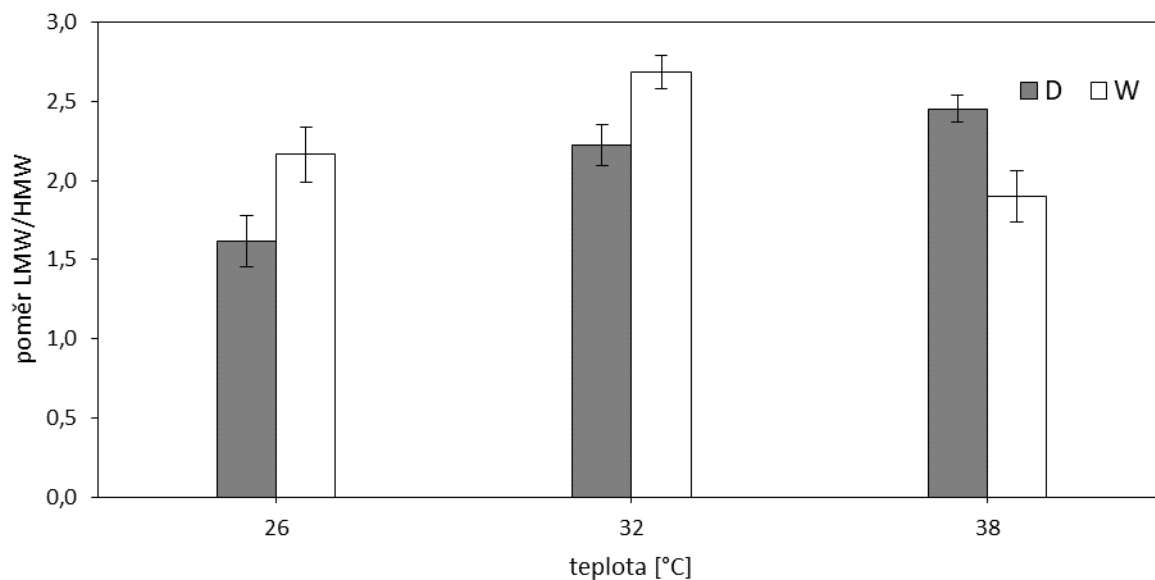
RGT



Obrázek 12: Poměr obsahu gluteninů k gliadinům odrůdy RGT při třech kultivačních teplotách za sucha (D) a za vlhka (W)

4.3 Poměr LMW/HMW za sucha a za vlhka při různých teplotách

Pannonia

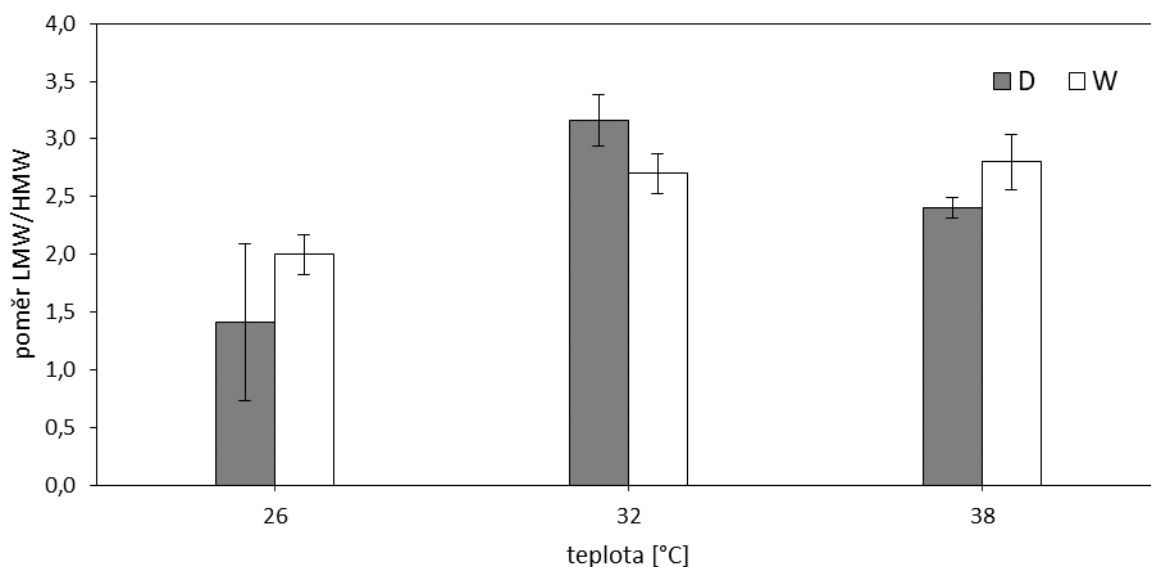


Obrázek 13: Poměr obsahu LMW ku HMW gluteninů odrůdy Pannonia při třech kultivačních teplotách za sucha (D) a za vlhka (W)

Obr. 13 ukazuje vliv sucha a vlhka na složení gluteninů při různých teplotách. U varianty, která byla stresována suchem vzrůstal poměr LMW/HMW postupně se zvyšující se teplotou. Nejvyšší poměr LMW/HMW byl naměřen při teplotě 38 °C. Do teploty 32 °C byl nárůst strmý, do teploty 38 °C pouze malý. U zavlažované varianty byl největší poměr LMW/HMW

při 32 °C, při krajních teplotách byl tento poměr menší. Pouze při nejvyšší kultivační teplotě byl poměr LMW/HMW vyšší u kultivace za sucha než za vlhka. Při ostatních kultivačních teplotách převládá poměr LMW/HMW za vlhka, u 26 °C je to o 25 % a u 32 °C o 17 %.

RGT



Obrázek 14: Poměr obsahu LMW ku HMW gluteninů odrůdy RGT při třech kultivačních teplotách za sucha (D) a za vlhka (W)

Jak je patrné z obrázku 14, tak poměr LMW/HMW při kultivaci za sucha vzrůstal do 32 °C, při teplotě 38 °C byl poměr LMW/HMW nižší. Při vlhkých kultivačních podmínkách byl nejvyšší poměr LMW/HMW při 32 °C a 38 °C. Při porovnání kultivace za sucha a za mokra byl vyšší poměr LMW/HMW za sucha pouze u kultivační teploty 32 °C než za mokra a to o 14 %. Stejný rozdíl byl při 38 °C, pouze poměr LMW/HMW byl vyšší u kultivace za vlhka než za sucha.

5. DISKUZE

V této bakalářské práci byl sledován vliv sucha a teploty na obsah gluteninů a na poměr gluteniny/gliadiny u dvou odrůd pšenice. Vzorky poskytl Ústav výzkumu globální změny AV ČR a použité odrůdy pšenice se jmenovaly Pannonia a RGT Reform. Pro separaci proteinů byla použita metoda SDS-PAGE a následné vyhodnocení bylo provedeno počítačovou denzitometrií.

Vliv odrůdy se ukázal jako stěžejní na obsah gluteninů a na poměr gluteniny/gliadiny. Rozdíly mezi odrůdami byly zřejmé už při pohledu na rozdělené lepkové proteiny na jednotlivých gelech, což se pak potvrdilo i při vyhodnocování. Více gliadinových frakcí obsahovala odrůda Pannonia, a také poměr gluteniny/gliadiny a LMW/HMW byl u této odrůdy jiný než u RGT.

Literatura uvádí [75][76], že vlivem vysokých teplot dochází ke zvýšení obsahu pšeničných bílkovin – roste množství gliadinové frakce, a naopak klesá množství gluteninové frakce. Výsledky, které byly získány v této práci, s tímto tvrzením souhlasí pouze u jedné odrůdy, a to u Pannonie. U odrůdy RGT byl tento efekt opačný a poměr gluteniny/gliadiny klesal s rostoucí teplotou.

Blumenthal a kol. [77] tvrdí, že teploty nad 35 °C způsobují snížení poměru gluteniny/gliadiny a podle Wardlaw a kol. [78], kteří pro svůj experiment vybrali odrůdy Plainsman V. a Fatima 2, dochází ke snížení obsahu HMW gluteninů. Výsledky této práce souhlasí s tvrzením, že poměr gluteniny/gliadiny klesá s rostoucí teplotou. Tato skutečnost se potvrdila u obou pěstovaných odrůd, které měly nejmenší poměr gluteniny/gliadiny právě při nejvyšší kultivační teplotě. Tvrzení Wardlaw a kol. bylo v této práci také potvrzeno. Díky rostoucímu poměru LMW/HMW můžeme usuzovat, že množství HMW podjednotek vlivem rostoucí teploty klesalo. V našem experimentu se tento vliv začal projevovat už při teplotě 32 °C.

Při působení samotného stresu suchem byly výsledky této práce opačné ve srovnání s dostupnou literaturou [76]. Ta tvrdí, že nejvyšší obsah proteinů v zrně je při spojení stresu suchem a vyšší teploty. Námi získané výsledky ukazují, že množství gluteninů bylo vyšší při zavlažované variantě, a to u obou odrůd. U odrůdy RGT bylo zjištěno, že při interakci sucha a rostoucí teploty, docházelo ke snižování množství gluteninů, což je v rozporu s literaturou [76]. U odrůdy Pannonia samotné sucho nemá velký vliv na obsah gluteninů, jedině až při interakci s teplotou.

U odrůdy Pannonia při současném působení vyšší teploty a sucha zůstával obsah gluteninů konstantní. Pro technologické vlastnosti těsta je však důležitější poměr gluteninů ku gliadinům. Ten se stoupající teplotou klesal, přičemž pokles byl zesílen při interakci teploty a sucha. Vzhledem k tomu, že gluteniny těstu dodávají pevnost a pružnost, dá se předpokládat, že při probíhajících klimatických změnách bude klesat pevnost a pružnost těsta vyrobeného z odrůdy Pannonia [43][44].

U odrůdy RGT byl při stoupající teplotě zjištěn mírný pokles obsahu gluteninů a výrazný pokles poměru gluteniny/gliadiny zvláště v interakci se suchem. Vzhledem k tomu, že pokles poměru gluteniny/gliadiny je větší než u odrůdy Pannonia, dá se předpokládat i větší zhoršení kvality těsta z odrůdy RGT při probíhajících klimatických změnách [44].

6. ZÁVĚR

Cílem této bakalářské práce bylo sledovat vliv teploty a sucha na gluteninovou frakci a na poměr gluteniny/gliadiny u dvou genotypů pšenice ozimé.

Pro experiment byly vybrány odrůdy Pannonia a RGT Reform. Pěstování pšenice probíhalo ve speciálních nádobách v půdě, která pocházela z experimentální stanice AV ČR v Polkovicích. Setí proběhlo v říjnu 2014 a v květnu 2015 byly nádoby přemístěny do kultivačních komor, ve kterých byla regulována teplota i vlhkost. Těmto podmínkám byly vystaveny rostliny po dobu 14 dní během fáze kvetení. Po uplynutí této doby byly rostliny vystaveny aktuálnímu počasí až do dosažení plné zralosti. Po sklizni byly jednotlivé vzorky semlety na mouku a dále byly zpracovávány postupem, který je popsán v experimentální části této práce – gliadiny a gluteniny byly extrahovány ze vzorku, rozděleny na jednotlivé zóny metodou SDS-PAGE a následně kvantifikovány počítačovou denzitometrií.

Na jednotlivé gluteninové a gliadinové frakce měl největší vliv genotyp. Odrůdy se markantně lišily obsahem gluteninů, poměrem gluteniny/gliadiny a složením gluteninů (poměrem nízkomolekulárních a vysokomolekulárních gluteninů).

U odrůdy Pannonia s rostoucí teplotou stoupal obsah gluteninů u zavlažované varianty, ale zůstával konstantní při interakci vyšší teploty a sucha. Na kvalitu těsta má však větší vliv poměr gluteniny/gliadiny, který při stoupající teplotě klesal, přičemž tento pokles byl větší při interakci vyšší teploty a sucha. Vzhledem k tomu, že gluteniny dodávají těstu pevnost a pružnost, dá se při současných klimatických změnách předpokládat zhoršení těchto parametrů.

U odrůdy RGT se stoupající teplotou klesal obsah gluteninů i poměr gluteniny/gliadiny, přičemž pokles byl větší při interakci vyšší teploty a sucha. Pokles poměru gluteniny/gliadiny byl větší než u odrůdy Pannonia, lze tedy predikovat, že zhoršení kvality lepku vlivem změny klimatu bude u odrůdy RGT markantnější než u odrůdy Pannonia.

7. SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] KRÄUCHI, N., E. POST, P. CONVEY, et al. Potential impacts of a climate change on forest ecosystems: Observations, Modeling, and Impacts. *Forest Pathology* [online]. 1993, 23(1), 28-50 [cit. 2019-03-07]. DOI: 10.1111/j.1439-0329.1993.tb00804.x. ISBN 10.1126/science.289.5487.2068. ISSN 1437-4781. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1439-0329.1993.tb00804.x>
- [2] JOOS, F. a R. SPAHNI. Rates of change in natural and anthropogenic radiative forcing over the past 20,000 years. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2008, 105(5), 1425-1430. DOI: 10.1073/pnas.0707386105. ISSN 0027-8424. Dostupné také z: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0707386105>
- [3] KEELING, C. D., S. C. PIPER, T. P. WHORF, et al. Evolution of natural and anthropogenic fluxes of atmospheric CO₂ from 1957 to 2003. *Tellus B: Chemical and Physical Meteorology* [online]. 2017, 63(1), 1-22 [cit. 2019-03-07]. DOI: 10.1111/j.1600-0889.2010.00507.x. ISSN 1600-0889. Dostupné z: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1111/j.1600-0889.2010.00507.x>
- [4] FARMER, G. a J. COOK. *Climate change science. A modern synthesis*. 1. vyd. Dordrecht: Springer, 2013. ISBN 978-940-0757-578.
- [5] *Global Climate Change: Vital Signs of the Planet* [online]. California: NASA, 2017 [cit. 2019-04-04]. Dostupné z: <https://climate.nasa.gov/>
- [6] MAREK, M. V. *Uhlík v ekosystémech České republiky v měnícím se klimatu*. Vyd. 1. Praha: Academia, 2011. Živá příroda. ISBN 978-80-904351-1-7.
- [7] RAMANATHAN, V., S. C. PIPER, T. P. WHORF, et al. The Greenhouse Theory of Climate Change: A Test by an Inadvertent Global Experiment. *Science* [online]. 1988, 240(4850), 293-299 [cit. 2019-03-07]. DOI: 10.1126/science.240.4850.293. ISSN 0036-8075. Dostupné z: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.240.4850.293>
- [8] WAHID, A., S. GELANI, M. ASHRAF a M. R. FOOLAD. Heat tolerance in plants: An overview. *Environmental and Experimental Botany* [online]. 2007, 61(3), 199-223 [cit. 2018-04-06]. DOI: 10.1016/j.envexpbot.2007.05.011. ISSN 0098-8472. Dostupné z: <http://dx.doi.org.ezproxy.lib.vutbr.cz/10.1016/j.envexpbot.2007.05.011>
- [9] FAOSTAT [online]. ©2017 [cit. 2019-03-26]. Dostupné z: <http://www.fao.org/home/en>
- [10] cs.wikipedia.org [online] [cit. 2018-03-10]. Dostupné z WWW: http://cs.wikipedia.org/wiki/Sklen%C3%ADkov%C3%BD_efekt#/media/File:Schema_sklenikovy_efekt.gif
- [11] Nátr, L.: *Koncentrace CO₂ a rostliny*. ISV nakladatelství Praha. 2000.
- [12] Srivastava, K. K. P.: Thermodynamic model of global warming. *Curr. Science* 75, 1 374 – 1 380, 1998.

- [13] GAJDOŠOVÁ, Alena; ŠTURDÍK, Ernest. Biologické, chemické a nutričně-zdravotné charakteristiky pekárských cereálií. Nova Biotechnologica. 2004, IV-1, s. 133-139. ISSN 1337-8783.
- [14] PŘÍHODA, Josef; SKŘIVAN, Pavel; HRUŠKOVÁ, Marie. Cereální chemie a technologie I: Cereální chemie, mlýnská technologie, technologie výroby těstovin. 1. vydání. Praha: VŠCHT, 2006. 202 s. ISBN 80-7080-530-7.
- [15] MARÍN, Santiago, Javier GIL-HUMANES, Alberto HERNANDO a Francisco BARRO. Characterization of α/β - and γ -Gliadins in Commercial Varieties and Breeding Lines of Durum Wheat Using MALDI-TOF and A-PAGE Gels. Biochemical Genetics [online]. 2011, 49(11-12), 735-747 [cit. 2018-09-15]. DOI: 10.1007/s10528-011-9446-4. ISSN 0006-2928. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s10528-011-9446-4>
- [16] THOMPSON, Tricia a Enrique MÉNDEZ. Commercial Assays to Assess Gluten Content of Gluten-Free Foods: Why They Are Not Created Equal. Journal of the American Dietetic Association [online]. 2008, 108(10), 1682-1687 [cit. 2018-09-15]. DOI: 10.1016/j.jada.2008.07.012. ISSN 00028223. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0002822308014090>
- [17] KADLEC, Pavel. Technologie potravin. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2002, 300 s. 02-329-6/02. ISBN 80-708-0509-9.
- [18] SHEWRY, P. R. The HEALTHGRAIN programme opens new opportunities for improving wheat for nutrition and health. Nutrition Bulletin. 2009, 34(2), 225-231. DOI: 10.1111/j.1467-3010.2009.01747.x. ISSN 14719827. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1467-3010.2009.01747.x>
- [19] SLAVÍČKOVÁ, R. Sledování kvality pšenice pro potravinářské účely. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2010. 48 s. Vedoucí bakalářské práce doc. Ing. Jiřina Omelková, CSc.
- [20] Cereální suroviny. In: KUČEROVÁ, Jindřiška. Zpracování zemědělských produktů-rostlinná část [online]. 2015 [cit. 2018-03-11]. Dostupné z: http://web2.mendelu.cz/af_291_projekty2/vseo/stranka.php?kod=3576
- [21] STEHNO, Z., V. DVOŘÁČEK a L. DOTLAČIL. Wheat protein fractions in relation to grain quality characters of the cultivars registered in the Czech Republic 2004-2006. In: Proceedings of the 11th International Wheat Genetics Symposium, 24-29 August 2008, Brisbane, Qld., Australia. Sydney: Sydney University Press, 2008, s. 556-559. ISBN 9781920899141.
- [22] OSBORNE, T. B. Vegetable proteins. London: Longsmas Green, 1924.
- [23] WIESER, Herbert, Remy MANDERSCHIED, Martin ERBS a Hans-Joachim WEIGEL. Effects of Elevated Atmospheric CO₂ Concentrations on the Quantitative Protein Composition of Wheat Grain. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2008,

- 56(15): 6531-6535. DOI: 10.1021/jf8008603. ISSN 0021-8561. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf8008603>
- [24] VELÍŠEK, Jan, a Jana HAJŠLOVÁ. *Chemie potravin. Rozš. a přepřac.* 3. vyd. Tábor: OSSIS, 2009. ISBN 978-80-86659-17-6.
- [25] FRA-MON, P., G. SALCEDO a C. ARAGONCILLO. Chromosomal assignment of genes controlling salt-soluble proteins (albumins and globulins) in wheat and related species. *Theoretical and Applied Genetics*. 1984, 69(2), 167-172. DOI: 10.1007/BF00272890.
- [26] GARCÍA DEL MORAL, L. F., Y. RHARRABTI, V. MARTOS a C. ROYO. Environmentally Induced Changes in Amino Acid Composition in the Grain of Durum Wheat Grown under Different Water and Temperature Regimes in a Mediterranean Environment. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2007, 55(20), 8144-8151 [cit. 2019-03-20]. DOI: 10.1021/jf063094q. ISSN 00218561. Dostupné z: <http://pubs.acs.org.ezproxy.lib.vutbr.cz/doi/abs/10.1021/jf063094q>
- [27] SINGH, J., M. BLUNDELL, G. TANNER aj. H. SKERRITT. Albumin and Globulin Proteins of Wheat Flour: Immunological and N-terminal Sequence Characterisation. *Journal of Cereal Science* [online]. 2001, 34(1), 85-103 [cit. 2019-03-29]. DOI: 10.1006/jcrs.2001.0380. ISSN 07335210. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0733521001903807>
- [28] BATTAIS, F., C. RICHARD, S. JACQUENET, S. DENERY-PAPINI, D. A. MONERET-VAUTRIN. Wheat grain allergies: an update on wheat allergens. *European Annals of Allergy and Clinical Immunology*. 2008, 40(3), 67-76. Dostupné také z: <http://www.eurannallergyimm.com/cont/journals-articles/122/volume-wheat-grain-allergies-update-allergens-321allasp1.pdf>
- [29] SHEWRY, P. R. Cereal seed storage proteins: structures, properties and role in grain utilization. *Journal of Experimental Botany*. 53(370), 947-958. DOI: 10.1093/jexbot/53.370.947. ISSN 14602431. Dostupné také z: <https://academic.oup.com/jxb/article-lookup/doi/10.1093/jexbot/53.370.947>
- [30] ŽILIĆ, Slađana, Miroljub BARAĆ, Mirjana PEŠIĆ, Dejan DODIG a Dragana IGNJATOVIĆ-MICIĆ. Characterization of Proteins from Grain of Different Bread and Durum Wheat Genotypes. *International Journal of Molecular Sciences*. 2011, 12(12), 5878-5894. DOI: 10.3390/ijms12095878. ISSN 1422-0067. Dostupné také z: <http://www.mdpi.com/1422-0067/12/9/5878/>
- [31] SHEWRY, P. R., J. A. NAPIER a A. S. TATHAM. Seed Storage Proteins: Structures and Biosynthesis. *The Plant Cell*. American Society of Plant Physiologists, 1995, 7(7), 945-956. DOI: 10.2307/3870049. ISSN 10404651.
- [32] WRIGLEY, C., F. BÉKÉS a W. BUSHUK. Gliadin and glutenin: the unique balance of wheat quality. St. Paul, Minn.: AACC International, 2006, x, 466 p. ISBN 978-189-1127-519.

- [33] WIESER, Herbert a Werner SEILMEIER. The influence of nitrogen fertilisation on quantities and proportions of different protein types in wheat flour. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 1998, 76(1): 49-55.
- [34] WEEGELS, P.L., R.J. HAMER a J.D. SCHOFIELD. Functional Properties of Wheat Glutenin. *Journal of Cereal Science*. 1996, 23(1): 1-17. DOI: 10.1006/jcrs.1996.0001. ISSN 07335210. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0733521096900016>
- [35] KULP K. A PONTE J. G., 2000: Handbook of cereal science and technology. 2nd ed., rev. and expanded. New York: Marcel Dekker, ix, 790 p. Food science and technology (Marcel Dekker, Inc.), v. 99. ISBN 0824782941.
- [36] COSTA, M. S., M. B. S. SCHOLZ a C. M. L. FRANCO. Effect of high and low molecular weight glutenin subunits, and subunits of gliadin on physicochemical parameters of different wheat genotypes. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* [online]. 2013, 33(3), 163-170 [cit. 2019-03-29]. DOI: 10.1590/S0101-20612013000500024. ISSN 1678-457x. Dostupné z: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext
- [37] EDWARDS, W. The science of bakery products. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2007, xiv, 259 p. ISBN 978-0-85404-486-3.
- [38] WIESER, H. Chemistry of gluten proteins. *Food Microbiology* [online]. 2007, 24(2), 115-119 [cit. 2019-03-29]. DOI: 10.1016/j.fm.2006.07.004. ISSN 0740-0020. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0740002006001535>
- [39] Nutrient uptake, transport and translocation in cereals: Influences of environment and farming conditions. Alnarp: Swedish University of Agricultural Sciences, 2009, 46 s. ISSN 1654-3580. Dostupné také z: http://pub.epsilon.slu.se/4083/1/malik_a_091030.pdf
- [40] BARAK, Sheweta, Deepak MUDGIL a B. S. KHATKAR. Biochemical and Functional Properties of Wheat Gliadins: A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2014, 55(3), 357-368. DOI: 10.1080/10408398.2012.654863. ISSN 1040-8398. Dostupné také z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10408398.2012.654863>
- [41] WIESER, H. Relation between gliadin structure and coeliac toxicity. *Acta Paediatrica*. 1996, 85(412), 3-9. DOI: 10.1111/j.1651-2227.1996.tb14239.x. ISSN: 1651-2227.
- [42] VERAVERBEKE W. S. A DELCOUR J. A, 2002: Wheat Protein Composition and Properties of Wheat Glutenin in Relation to Breadmaking Functionality. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 42(3): 179-208. ISSN 1040-8398.
- [43] DENDY, D A DOBRASZCZYK B. J., 2001: Cereals and cereal products: chemistry and technology. Gaithersburg, Md.: Aspen Publishers, xii, 429 p. ISBN 0834217678.
- [44] GIANIBELLI, M. C., LARROQUE O. R., MACRITCHIE F., A WRIGLEY C. W., 2001: Biochemical, Genetic, and Molecular Characterization of Wheat Glutenin and Its Component Subunits. *Cereal Chemistry*, 78(6), 635-646. ISSN 0009-0352.

- [45] HAMER R. J. A HOSENEY R., 1998: Interactions-the keys to cereal quality. St. Paul, Minn.: American Association of Cereal Chemists, ix, 173 p. ISBN 0913250996.
- [46] MCINTOSH R. A., DUBCOVSKY J., ROGERS W. J., MORRIS C. F., APPELS R. A XIA X. C., 2011: Catalogue of gene symbols for wheat: 2011 Supplement. 2010. Annual Wheat Newsletter 57: 303-321.
- [47] SHEWRY, P.R. a A.S. TATHAM. Disulphide Bonds in Wheat Gluten Proteins. Journal of Cereal Science. 1997, 25(3): 207-227. DOI: 10.1006/jcrs.1996.0100. ISSN 07335210. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0733521096901009>
- [48] WIESER, H. a R. KIEFFER. Correlations of the Amount of Gluten Protein Types to the Technological Properties of Wheat Flours Determined on a Micro-scale. Journal of Cereal Science. 2001, 34(1): 19-27. DOI: 10.1006/jcrs.2000.0385. ISSN 07335210. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0733521000903850>
- [49] GIANIBELLI, M. C., O. R. LARROQUE, F. MACRITCHIE a C. W. WRIGLEY. Biochemical, Genetic, and Molecular Characterization of Wheat Glutenin and Its Component Subunits. Cereal Chemistry. 2001, 78(6), 635-646. DOI: 10.1094/CCHEM.2001.78.6.635. Dostupné také z: <http://cerealchemistry.aaccnet.org/doi/abs/10.1094/CCHEM.2001.78.6.635>
- [50] GAO L. Ng P.K.W., Bushuk, W, 1992, Structure of glutenin based on farinograph and electrophoretic results, Cereal Chem., 69, 452.
- [51] ZIMOLKA, Josef a KOL. Pšenice: pěstování, hodnocení a užití zrna. Praha: Profi Press, 2005. ISBN 978-808-6726-090.
- [52] NOVOTNÝ, F. a K. HRUBÍK. Nové směry v hodnocení jakosti potravinářské pšenice. Obilnářské listy. 1997, 5(3), 49-52.
- [53] ČSN 46 1100-2. Obiloviny potravinářské – Část 2: Pšenice potravinářská. Praha: Český normalizační institut, 2001. 8 s.
- [54] PRUGAR, Jaroslav. Kvalita rostlinných produktů na prahu 3. tisíciletí. Praha: Výzkumný ústav pivovarský a sladařský ve spolupráci s komisí jakosti rostlinných produktů ČAZV, 2008, 327 s. ISBN 978-80-86576-28-2.
- [55] HRUBÍK, K. a F. NOVOTNÝ. Nové směry v hodnocení jakosti potravinářské pšenice. Obilnářské listy. 1997, 5(3), 49-52.
- [56] KABÁTOVÁ, Naděžda, Radvana ŠULOVÁ a Pavel RYŠAVÝ. Jednotné pracovní postupy – Testování odrůd. Brno: Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský, Národní referenční laboratoř, 2012, 1 CD-ROM. ISBN 978-80-7401-063-7
- [57] Kvalita pšenice a jak ji zjistíme? In: Selgen [online]. Praha: Selgen a.s., ©2017 [cit. 2019-03-27]. Dostupné z: <http://selgen.cz/sprava/wp-content/uploads/2012/02/Kvalita-pšenice-a-jak-ji-zjistíme.doc.pdf>

- [58] THOMPSON, Tricia a Enrique MÉNDEZ. Commercial Assays to Assess Gluten Content of Gluten-Free Foods: Why They Are Not Created Equal. *Journal of the American Dietetic Association* [online]. 2008, 108(10), 1682-1687 [cit. 2019-04-15]. DOI: 10.1016/j.jada.2008.07.012. ISSN 00028223. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0002822308014090>
- [59] Pekařská technologie. I., Suroviny. Praha: Pekař a cukrář, 2013. ISBN 978-80-903913-7-6.
- [60] KREJČÍŘOVÁ, L., I. CAPOUCHOVÁ a J. PETR. Skladba bílkovin a technologická jakost ozimé pšenice z ekologického a konvenčního způsobu pěstování. In: Sborník z konference: Ekologické zemědělství 2007. Praha: Česká zemědělská univerzita, 2007, s. 76-78. ISBN 978-80-213-1611-9.
- [61] ČSN EN ISO 3093. Pšenice, žito a pšeničná a žitná mouka, pšenice tvrdá (durum) a semolina z pšenice tvrdé – Stanovení čísla poklesu podle Hagberga-Pertena. Praha: Úřad pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví, 2011. 20 s.
- [62] ČSN EN ISO 7971-3. Obiloviny – Stanovení objemové hmotnosti zvané "hektolitrová váha" - Část 3: Rutinní metoda. Praha: Úřad pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví, 2010. 28 s.
- [63] ČSN EN ISO 5530-1. Pšeničná mouka – Fyzikální vlastnosti těsta – Část 1: Stanovení absorpce vody a reologických vlastností pomocí farinografu, Praha: Úřad pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví, 2015. 40 s.
- [64] ČSN 46 1100-1. Obiloviny potravinářské – Část 1: Společná ustanovení. Praha: Český normalizační institut, 2001.
- [65] ČSN ISO 2171 (461019). Obiloviny, luštěniny a výrobky z nich – Stanovení obsahu popela spalováním. Praha: Český normalizační institut, 2008. 16 s.
- [66] PELIKÁN, M. a SUKOVÁ, M. 1998. Hodnocení a využití rostlinných produktů: (návody do cvičení). 1. vyd. České Budějovice: Jihočeská univerzita. ISBN 8070402792.
- [67] PETR, J. a LOUDA, F. 1998. Produkce potravinářských surovin. Vyd. 1. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická. ISBN 8070803320.
- [68] BIETZ, J.A. a D.G. SIMPSON. Electrophoresis and chromatography of wheat proteins: available methods, and procedures for statistical evaluation of the data. *Journal of Chromatography A*. 1992, 624(1-2), 53-80. DOI: 10.1016/0021-9673(92)85674-I. ISSN 00219673. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/002196739285674I>
- [69] GARCA-DESCALZO, Laura, Eva GARCA-LPEZ, Alberto ALCZAR, Fernando BAQUERO a Cristina CI. Gel Electrophoresis of Proteins. *Gel Electrophoresis – Principles and Basics*. InTech, 2012. DOI: 10.5772/37514. ISBN 978-953-51-0458-2. Dostupné také z: <http://www.intechopen.com/books/gel-electrophoresis-principles-and-basics/gelectrophoresis-of-proteins>

- [70] ÖTLEŞ, Semih. Handbook of food analysis instruments. Boca Raton, FL: CRC Press, c 2009, xv, 525 p. ISBN 14-200-4566-0.
- [71] KÁŠ, Jan, Milan KODÍČEK a Olga VALENTOVÁ. Laboratorní techniky biochemie. Praha: VŠCHT, 2005. ISBN 978-807-0805-862.
- [72] BEAN, S.R a G.L LOOKHART. Electrophoresis of cereal storage proteins. Journal of Chromatography A. 2000, 881(1-2), 23-36. DOI: 10.1016/S0021-9673(99)01270-4. ISSN 00219673. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967399012704>
- [73] GARCA-DESCALZO, Laura, Eva GARCA-LPEZ, Alberto ALCZAR, Fernando BAQUERO a Cristina CI. Gel Electrophoresis of Proteins. Gel Electrophoresis – Principles and Basics. InTech, 2012. DOI: 10.5772/37514. ISBN 978-953-51-0458-2. Dostupné také z: <http://www.intechopen.com/books/gel-electrophoresis-principles-and-basics/gelectrophoresis-of-proteins>
- [74] STRINGFELLOW, A.C., J.S. WALL, G.L. DONALDSON a R.A. ANDRESON, 1976. " Protein and amino acid compositions of dry-milled and air-classified fractions of triticale grain [Varieties] ". *Cereal Chemistry*. **1976**(1), 51–60. ISSN 0009-0352.
- [75] GUPTA, R. B., I. L. BATEY a F. MACRITCHIE. Relationships between protein composition and functional properties of wheat flours. *Cereal chemistry*. 1992, 69(2), 125-131. ISSN 00090352.
- [76] DANIEL, C. a E. TRIBOÏ. Effects of Temperature and Nitrogen Nutrition on the Grain Composition of Winter Wheat: Effects on Gliadin Content and Composition. *Journal of Cereal Science* [online]. 2000, 32(1), 45-56 [cit. 2019-04-20]. DOI: 10.1006/jcrs.2000.0313. ISSN 07335210. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0733521000903138>
- [77] BLUMENTHAL, C. S., I. L. BATEY, F. BEKES, C. W. WRIGLEY a E. W. R. BARLOW. Seasonal changes in wheat-grain quality associated with high temperatures during grain filling. *Australian Journal of Agricultural Research*. 1991, 42(1), 21-30. DOI: 10.1071/AR9910021. ISSN 0004-9409.
- [78] WARDLAW, I. F., C. BLUMENTHAL, O. LARROQUE, C. W. WRIGLEY a E. W. R. BARLOW. Contrasting effects of chronic heat stress and heat shock on kernel weight and flour quality in wheat. *Functional Plant Biology*. 2002, 29(1), 25-34. DOI: 10.1071/PP00147. ISSN 1445-4408.

8. SEZNAM ZKRATEK

AV ČR	Akademie věd České republiky
DTT	dithiothreitol
HMW	high molecular weight
LMW	low molecular weight
NIR	near infrared spectometry
SDS	sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti SDS
TEMED	N, N, N', N'-tetramethylethyldiamin
TRIS	tris(hydroxymethyl)aminomethan